



**Universitat Ramon Llull**

## **TESI DOCTORAL**

**Títol**    Anàlisi i avaluació de l'exposició a les aflatoxines i a l'ocratoxina A, a partir de compost.

**Realitzada per**            Anna Cuadrench i Tripiana

**en el Centre**                IQS School of Engineering

**i en el Departament**    Bioenginyeria

**Dirigida per**                Dra. Montserrat Agut i Bonsfills  
Dr. Lluís Comellas i Riera

(...) La gent que vivim al camp no podem ser uns ploramiques eterns, sinó uns innovadors i renovadors constants.

Xavier Jounou i Bajo. Alcalde de Solsona (2007-2010).

Fragment del seu text de comiat.

A la meva filla Jana. Perquè pugui créixer en un país socialment just i lliure. Perquè  
procuri deixar-lo millor que l'ha trobat.

AGRAÏMENTS.

---

## AGRAÏMENTS

Voldria expressar els meus agraïments a totes aquelles persones que m'han ajudat a dur a terme aquest treball:

A l'Institut Químic de Sarrià per la concessió de la beca de doctorat que m'ha permès la realització d'aquesta Tesi.

Al Ministeri d'educació i ciència pel finançament del Pla Nacional "Ecotoxicidad, micotoxinas y degradación de nonilfenoles en lodos de depuradora y suelos tratados"

A la Dra. Agut i al Dr. Comellas per la seva dedicació i pel seu esforç, pels bons consells, per tot el que m'han ensenyat en el transcurs d'aquest projecte.

A la gent de la secció de cromatografia: Dr. Broto, Cristina, Gemma, Jordi, Eusebi, Mayte, Joel i Cèlia.

A la gent de la secció de microbiologia: Helena, Patri, Óscar, Claudia, Janet i Xavi.

Al Dr. Planas i al Dr. Abellà, caps dels departaments de Bioenginyeria i de Química Analítica. A tot el personal que forma part d'aquests departaments. Gràcies per la vostra ajuda.

Al Dr. Sergi Colominas per donar-me bons consells i per les bones estones compartides.

Als meus alumnes de l'IQS, he après molt de vosaltres.

A la meua filla Jana i a l'Oriol. Als meus pares, Joan i Adelina; al meu germà Pere i a la Mercè. A la tieta Conxita. Als tiets Àngels, Jaume, Conxita i Paco. A la Mei. La Rosa i el Ramon. A les meves cosines, cunyades i cosins: la Natàlia i la Claustre, la Marta i la Mireia, el Jordi i l'Ignasi. A tots els Triplanes del món! A la gent de la família que ja no hi són. Gràcies, gràcies i gràcies!

Als amics/gues que estimo (ells ja saben qui són). Gràcies per acompanyar-me. A la gent amb qui comparteixo estones al Cantàbric i a l'Alzina.

A l'Anna Terricabras i a la seva família, especialment a l'Emília, a la Maria, a la Nina i a l'Aila.

A la Pilar i a la seva família.

Al Joan i a la Mariona.

A l'Íngrid i a la seva família. Al grup de mares del whatsapp. A les Hola Guapes, Jan i Oriol.

A les persones amb qui he coincidit a les entitats a les quals he dedicat el meu temps lliure, sobretot a l'escoltisme i el guiatge, i a l'Orfeó Nova Solsona. A la família de 4 vents: Albert, Alessandra, Anaïs, Bel, Sílvia, Xexo, Vicent i especialment al David. Gràcies pels bons moments. Seguim, ni un pas enrere !

A l'Elisenda Cirera, l'Helena i a l'Anna Esteve. A la Dra. Verdaguer (l'Ari), a l'Oriol, la Patri, Pol i Jordi Armengol. Pels dinars i esmorzars que encara ara trobo a faltar.

A tots vosaltres, moltíssimes gràcies per la vostra ajuda!

Anna Cuadrench i Triplana.

Solsona, Catalunya, Països Catalans. Abril del 2014.



Aquest estudi s'ha realitzat en els laboratoris de microbiologia i cromatografia de l'IQS, Universitat Ramon Llull, en el marc del projecte del Pla Nacional titulat: *Ecotoxicidad, micotoxinas y degradación de nonilfenoles en lodos de depuradora y suelos tratados*, finançat pel Ministeri d'educació i ciència, amb número de referència: CTM2006-14163-C02-02, en col·laboració amb el Centre de Recerca i Aplicacions Forestals (CREAF).

En la present Tesi doctoral s'ha valorat el contingut fúngic d'un total de 18 mostres de compost: 7 procedents de la planta de compostatge de Manresa, 6 de la de Blanes, dues procedents de residu sòlid urbà processat a la planta de CESPÀ de Can Barba, (Vallès Occidental), dues de compost casolà de Pineda de Mar i, finalment, una procedent de femta de cavall obtinguda en un comerç especialitzat en productes de jardineria. Les anàlisis s'han realitzat entre els anys 2007-2010.

Per a cada una de les mostres s'ha realitzat el càlcul de les unitats formadores de colònia de fong, ufc/g; s'han identificat els fongs de cada una de les mostres pel que fa al gènere i se n'han seleccionat els *Aspergillus* i els *Penicillium*, que s'han incubat seguint el mètode de la FDA per a comprovar si poden produir les aflatoxines G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> i l'OTA. Cap dels fongs potencialment micotoxigènics aïllats ha donat positiu en la producció de les toxines estudiades per sobre del límit de detecció quan s'han aplicat els mètodes cromatogràfics descrits en el treball.

Per aquest motiu, s'estudia si el compost és un substrat adequat per a la producció d'aflatoxines incubant la soca de control *Aspergillus parasiticus* CECT 2681, descrita com a productora d'aflatoxines, sobre diferents proporcions de mescles d'arròs-compost. Després de comprovar que la soca control no pot produir les toxines quan el fong es desenvolupa sobre un 100% de compost, es comprova si pot continuar-ho fent sobre arròs. També es comprova si la soca control perd la seva capacitat micotoxigènica en ser incubada sobre compost i després sobre arròs. Per a realitzar aquesta anàlisi s'utilitza un mètode desenvolupat a la secció d'UHPLC-UV.

Amb les diferents proves realitzades amb la soca de control *Aspergillus parasiticus* CECT 2681, es conclou que la soca control no perd la seva capacitat micotoxigènica en ser incubada primer sobre compost i després sobre arròs. També es pot concloure que el compost no és un bon substrat per a la producció d'aflatoxines ja que la producció d'aquestes disminueix en augmentar la proporció de compost en el substrat de creixement del fong.

## RESUMEN:

En la presente Tesis doctoral se ha valorado el contenido fúngico de un total de 18 muestras de compost: 7 procedentes de la planta de compostaje de Manresa, 6 de la de Blanes, dos procedentes de residuo sólido urbano procesado en la planta de CESPÀ, Can Barba (Barcelona), dos de compost casero de Pineda de Mar y, finalmente, una procedente de heces de caballo obtenida en un comercio especializado en productos de jardinería.

Para cada una de las muestras se ha realizado el cálculo de las unidades formadoras de colonia de hongo, ufc / g; se han identificado los hongos de cada una de las muestras a nivel de género y se han seleccionado los *Aspergillus* y *Penicillium*, que se han incubado siguiendo el método de la FDA, para comprobar si pueden producir las aflatoxinas G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> y la OTA. Ninguno de los hongos potencialmente micotoxigénicos aislados ha dado positivo en la producción de las toxinas estudiadas por encima del límite de detección, cuando se han aplicado los métodos cromatográficos descritos en este trabajo.

Por este motivo, se estudia si el compost es un sustrato adecuado para la producción de aflatoxinas incubando la cepa de control *Aspergillus parasiticus* CECT 2681, descrita como productora de aflatoxinas, sobre diferentes proporciones de mezclas de arroz - compost. Tras comprobar que la cepa control no puede producir las toxinas cuando el hongo se desarrolla sobre un 100% de compost, se comprueba si puede seguir haciéndolo sobre arroz. También se comprueba si la cepa control pierde su capacidad micotoxigénica al ser incubada sobre compost y luego sobre arroz. Para realizar este análisis se utiliza un método desarrollado en la sección de UHPLC-UV.

Las diferentes pruebas realizadas con la cepa de control *Aspergillus parasiticus* CECT 2681, concluyen que la cepa control no pierde su capacidad micotoxigénica al ser incubada primero sobre compost y luego sobre arroz. También se puede concluir que el compost no es un buen sustrato para la producción de aflatoxinas ya que la producción de estas disminuye al aumentar la proporción de compost en el sustrato de crecimiento del hongo.



## SUMMARY:

In this doctoral thesis we evaluated the fungal content of a total of 18 compost samples: 7 from the composting plant from Manresa, 6 from Blanes, 2 from urban solid waste from the processing plant CESPÀ, Can Barba (Vallès Occidental), two from homemade compost from Pineda de Mar and finally, one sample of fecal horse obtained in a trade specialized in gardening products.

For each one of the samples the calculation of the fungus colony forming units, cfu / g, has been carried out; fungi have been identified for each of the samples at the level of genera. *Aspergillus* and *Penicillium* have been selected and have been incubated following the FDA method to verify if they can produce aflatoxins G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> and OTA. Any of the isolated micotoxigenic fungi has positive production of the studied toxins over the detection limit when we have applied the chromatographic methods described in this work.

For this reason, we study if compost is an appropriate substrate to produce aflatoxins by incubating control strain *Aspergillus parasiticus* CECT 2681, described as a producer of aflatoxins, in different proportions of rice-compost mixtures. After verifying that the control strain cannot produce toxins when the fungus grows on a 100% of compost, we verify if it can continue to produce toxins over the rice. It also verifies if the control strain loses its micotoxigenic capacity when it was incubated over compost and then over rice. To do this analysis we use a UHPLC-UV method developed in our section.

To the different analyses realized with control strain *Aspergillus parasiticus* CECT 2681, we conclude that the strain does not lose its micotoxigenic capacity when being made on first and then incubated over rice. It can also be concluded that the compost is not a good substrate for aflatoxins production because the aflatoxins production decreases when the proportion of compost increases in the growth fungal substrate.

ACRÒNIMS.

---

- ACA: Agència Catalana de l'Aigua.
- AFB<sub>1</sub>: Aflatoxina B<sub>1</sub>.
- AFB<sub>2</sub>: Aflatoxina B<sub>2</sub>.
- AFG<sub>1</sub>: Aflatoxina G<sub>1</sub>.
- AFG<sub>2</sub>: Aflatoxina G<sub>2</sub>.
- AFM<sub>1</sub>: Aflatoxina M<sub>1</sub>.
- AFM<sub>2</sub>: Aflatoxina M<sub>2</sub>.
- AFSSA: Agència Francesa de Seguretat Alimentària.
- AGV: Àcids Grassos Volàtils.
- AOAC: *Association of Analytical Chemists*.
- a<sub>w</sub>: Activitat de l'aigua.
- BOE: Butlletí Oficial de l'Estat.
- CECT: Colecció Espanyola de Cultius Tipus.
- CESPAS: Companyia Espanyola de Serveis Públics Auxiliars.
- CREA: Centre de Recerca Ecològica i Aplicacions Forestals.
- DAD: Diode Array Detector.
- Dc: Voltatge en contínua.
- EDAR: Estació Depuradora d' Aigües Residuals.
- ELISA: Assaig immunosorbent amb enzim lligat (*Enzim-Linked Immunosorbent Assays*).
- ESI: Ionització per electrospray (*Electrospray Ionization*).
- FDA: *Food and Drug Administration*.
- FVO: *Food and Veterinary Office*.
- HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*.
- HRE: Humitat Relativa d'Equilibri.
- M.S: Matèria Seca.
- IARC: Agència Internacional per a la Recerca sobre el Càncer (*International Agency of Research on Cancer*).
- LD: Límit de detecció.
- LQ: Límit de quantificació
- m/z: Relació massa/càrrega d'un ió.
- OTA: Ocratoxina A.
- PAC: Policlorur d'Alumini.
- PAO: Organismes acumuladors d'oxigen (*Phosphorous Acumulator Organisms*).

- PDA: Agar de patata i dextrosa (*Potato Dextrose Agar*).
- PNLD: Pla Nacional de Fangs de Depuradores d'Aigües Residuals.
- Q1, Q2, Q3: Primer quadripol, segon quadripol i tercer quadripol.
- Rf: Radiofreqüència.
- SCAN: Escaneig en un rang de masses.
- SIM: *Selected ion monitoring*.
- SPE: Extracció en fase sòlida (*Solid Phase Extraction*).
- TLC: *Thin Layer Chromatography*.
- UFC: Unitats Formadores de Colònia.
- UHPLC: *Ultra High Performance Liquid Chromatography*.
- UV: Ultraviolada.



<b>1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS.....</b>	<b>1</b>
<b>2. PART TEÒRICA.....</b>	<b>7</b>
2.1. Fangs de depuradores urbanes.....	7
2.1.1. Generació dels fangs de depuradora.....	8
2.1.2. Tractament dels fangs de depuradora.....	9
2.1.3. Posttractament dels fangs de depuradora.....	15
2.1.3.1. Assecament tèrmic.....	15
2.1.3.2. Compostatge dels fangs de depuradora.....	16
2.1.3.3. Compostatge casolà.....	18
2.1.3.4. Compostatge orgànic procedent de fems de cavall.....	19
2.1.3.5. Compostatge procedent de Residu Sòlid Urbà orgànic (CESPA).....	20
2.1.3.6. Factors que condicionen el procés de compostatge.....	21
2.2. Origen de les aflatoxines i ocratoxines.....	22
2.2.1. Naturalesa i propietats químiques de les aflatoxines.....	25
2.2.2. Naturalesa i propietats químiques de les ocratoxines.....	26
2.3. Fongs productors de toxines.....	28
2.3.1. Gènere <i>Aspergillus</i> .....	28
2.3.1.1. Taxonomia del gènere <i>Aspergillus</i> .....	28
2.3.1.2. Micotoxines del gènere <i>Aspergillus</i> .....	30
2.3.2. Gènere <i>Penicillium</i> .....	31
2.3.2.1. Taxonomia del gènere <i>Penicillium</i> .....	31
2.3.2.2. Micotoxines del gènere <i>Penicillium</i> .....	34
2.3.3. Relació Fong Micotoxina.....	35
2.3.3.1. Factors que afecten el creixement fúngic i la producció de toxines.....	38
2.3.3.1.1. Factors físics.....	38
2.3.3.1.2. Factors químics.....	41
2.3.3.1.3. Factors biològics.....	42
2.4. Soques productores de toxines <i>Aspergillus parasiticus</i> i <i>Aspergillus ochraceus</i> .....	43
2.4.1. Síntesis de les aflatoxines i l'ocratoxina A.....	43
2.5. Freqüència i toxicitat.....	46
2.6. Legislació sobre micotoxines.....	47
2.6.1. Altres matrius on es poden trobar les aflatoxines.....	49
2.7. Detecció de fongs micotoxigènics.....	50

2.8. Mètode de la Food and Drug Administration per a la detecció de micotoxines.....	50
2.8.1. Control de micotoxines.....	50
2.8.1.1. Extracció en fase líquida.....	51
2.8.1.2. Extracció en fase sòlida.....	53
2.9. Tècniques cromatogràfiques.....	55
2.9.1. Cromatografia de capa fina (TLC).....	55
2.9.2. Cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC).....	57
2.9.3. Cromatografia líquida d'alt rendiment (UHPLC).....	58
2.9.4. Espectrometria de masses (MS).....	60
<b>3.- PART EXPERIMENTAL I DISCUSSIÓ DE RESULTATS.....</b>	<b>67</b>
3.1. Consideracions prèvies.....	68
3.1.1. Mesures de seguretat.....	68
3.1.2. Mesures d'esterilitat.....	69
3.1.3. Preparació de patrons.....	70
3.1.4. Recuperació de soques liofilitzades.....	70
3.2. Tipus de mostres.....	72
3.2.1. Sistema de producció de Blanes i el seu compost.....	72
3.2.2. Sistema de producció de Manresa i el seu compost.....	74
3.2.3. Sistema de producció casolà i el seu compost.....	76
3.2.4. Sistema de producció de la planta de Can Barba a partir de residu sòlid urbà.....	77
3.2.5. Sistema de producció de compost de cavall a partir de fems de cavall.....	78
3.2.6. Recull de les mostres analitzades de fangs de depuradora urbana i de composts finals procedents de diferents matèries primeres.....	79
3.3. Anàlisi microbiològica de les diferents mostres de fang i dels compost finals.....	80
3.3.1. Elecció del medi de cultiu.....	80
3.3.2. Recompte de floridures presents en les diferents mostres analitzades.....	82
3.4. Identificació dels fongs presents a cada mostra de fang i dels composts finals a nivell de gènere segons l'observació macroscòpica i microscòpica de les colònies.....	86
3.5. Detecció de soques potencialment micotoxigèniques d' <i>Aspergillus</i> i de <i>Penicillium</i> .....	95
3.5.1. Mètode de la Food and Drug Administration per a la detecció de soques productores de toxines.....	97
3.5.2. Solvent d'extracció de les aflatoxines B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> i ocratoxina A en arròs.....	98

3.5.3. Solvent d'extracció de les aflatoxines B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> i ocratoxina A en compost.....	99
3.5.3.1. Variació del mètode de FDA.....	100
3.5.4. Condicions cromatogràfiques per a la detecció d'aflatoxines i ocratoxina A.....	100
3.5.4.1 Mètode HPLC-DAD-MS (1).....	101
3.5.4.2 Mètode UHPLC-UV (2).....	105
3.5.4.3 Límit de detecció (LD) i límit de quantificació (LQ) pels detectors DAD, MS i UV.....	106
3.5.4.4 Comparació dels dos mètodes cromatogràfics: HPLC-DAD-MS (1) i UHPLC-UV (2).....	108
3.5.5. Càlcul de la recuperació d'aflatoxines adicionades sobre arròs i sobre compost per HPLC-DAD.....	109
3.6. Comprovació de la producció d'aflatoxines B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> i ocratoxina A a partir de les soques <i>Aspergillus parasiticus</i> CECT 2681 i <i>Aspergillus ochraceus</i> CECT 2948 sobre arròs i sobre compost.....	111
3.6.1. Comprovació de la producció d'aflatoxines B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> i ocratoxina A en arròs a partir de les soques <i>Aspergillus parasiticus</i> CECT 2681 i <i>Aspergillus ochraceus</i> CECT 2948 per HPLC-DAD-MS.....	112
3.6.2. Estudi comparatiu de la quantificació per espectrometria de masses de la producció de toxines en funció del seguiment dels ions primaris i secundaris per part de les soques de control <i>Aspergillus parasiticus</i> CECT 2681 i <i>Aspergillus ochraceus</i> CECT 2948.....	121
3.6.3. Avaluació de la capacitat de producció d'aflatoxines B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> i ocratoxina A en compost final de Blanes i Manresa per part de les soques <i>Aspergillus parasiticus</i> CECT 2681 i <i>Aspergillus ochraceus</i> CECT 2948 per HPLC-DAD-MS.....	123
3.7. Comprovació de la capacitat micotoxigènica de la soca <i>Aspergillus parasiticus</i> CECT 2681 sembrada primer sobre compost i després sembrada sobre arròs per UHPLC-UV.....	130
3.8. Comprovació de la producció d'aflatoxines en matrius de barreges arròs i compost en diferent proporció per UHPLC-UV.....	132
3.9. Resum dels apartats 3.6, 3.7 i 3.8.....	136
3.10. Comprovació de la producció de les aflatoxines B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> i l'ocratoxina A per part dels fongs aïllats de les mostres de les plantes de Blanes i Manresa i de les diferents mostres de composts finals.....	137
<b>4. CONCLUSIONS.....</b>	<b>140</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>142</b>



6.	ANNEX.....	148
----	------------	-----

INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS.

---

L'augment de població i el ritme de vida de la societat actual consumeix molts recursos naturals i genera unes quantitats de residus molt elevades. De tots els recursos naturals, l'aigua n'és un dels més importants ja que és un bé escàs i, per tant, en cal gestionar la demanda i l'eficiència en el seu ús, mitjançant el seu aprofitament i la seva depuració un cop utilitzada. Després d'haver-ne efectuat la depuració, cal donar una aplicació als residus que es generen.

Cada vegada més, la societat demana l'adopció ràpida d'un conjunt d'actuacions que garanteixin l'accés a l'aigua, en condicions de quantitat i qualitat adequades i a la vegada, que es preservin els nostres recursos hídrics i els ecosistemes aquàtics associats.

El procés de depuració de les aigües residuals genera un residu anomenat "fang de depuradora".

Els fangs de depuradora i una inadequada gestió dels mateixos, poden esdevenir una font molt important de degradació del medi ambient (contaminació atmosfèrica, contaminació dels sòls, contaminació de les aigües, alteració dels ecosistemes, problemes de salut, etc.). Si cada cop se'n generen més, el que cal fer és valoritzar-los amb procediments que en permetin el seu aprofitament. (ACA, 2010).

El fang és un material complex constituït per aminosucres, proteïnes i pèptids, polisacàrids, lípids, d'altres substàncies polimèriques, una gran varietat de substàncies que contenen nitrogen i fòsfor i altres compostos que depenen de la procedència de les aigües residuals. (Bagó, 2005).

És important també tenir en compte la possible presència d'organismes patògens en el fang inicial, així com també la seva possible persistència dins del compost ja que aquest s'utilitza com a adob. L'ús del compost com a adob permet poder-lo reincorporar al cicle natural. El Pla Nacional Integrat de Residus estatal (2008-2015) té com a objectiu que un 84% dels biosòlids eliminats siguin aplicats i valoritzats en usos agrícoles en forma de compost, de digestió o d'assecatge tèrmic.

Per poder reduir el volum d'aquest residu i proporcionar-li un destí és necessari un tractament perquè perdi, principalment, l'aigua que conté. Un dels possibles tractaments és el compostatge.

L'objectiu del compostatge és, bàsicament, convertir la matèria orgànica present en els fangs deshidratats en humus estable, gràcies a l'acció de certs microorganismes que es troben presents en el fang. El procés es duu a terme al llarg de diverses etapes i, tractant-se d'un procés exotèrmic, es passa per diferents temperatures i per diverses transformacions microbianes. Durant el procés i en la totalitat de les seves etapes, les temperatures arriben des de 40°C i fins als 60°C. En aquest marge de temperatures hi actuaran diferents microorganismes com fongs i/o bacteris.

L'acció humana només es limita a proporcionar les condicions òptimes perquè es faci amb la màxima rapidesa i eficàcia, i cal destacar que el compostatge amb residus vegetals (escorça de pi, encenalls de fusta, etc.) millora les qualitats físiques i sanitàries del producte, tot i que resulta costós, és lent i necessita molt d'espai per a la seva producció.

Durant el procés de compostatge, per una banda s'arriba a temperatures on poden créixer els fongs productors de toxines; i per l'altra, les toxines, si hi són produïdes, hi poden romandre ja que no s'arriba a suficient temperatura per a destruir-les. Aquests fongs productors tenen la seva temperatura òptima de creixement des de 27-30°C i fins a una màxima que es troba entre 40-42°C mentre que per a destruir moltes de les toxines produïdes per un fong, es necessiten temperatures superiors a 250°C.

El *Programa d'Actuacions per a la Gestió dels Fangs de Depuració d'Aigües Residuals Urbanes* (2006-2015) té com a objectiu contribuir en l'optimització tècnica, ambiental i econòmica de la gestió dels fangs de depuradores d'aigües residuals urbanes de Catalunya. És per aquest motiu que és important conèixer la seva composició i la presència d'organismes patògens o de toxines, com les micotoxines.

Les micotoxines són un grup de metabòlits secundaris d'origen fúngic caracteritzades per presentar una toxicitat heterogènia tant per a l'home com per als animals. Poden causar efectes carcinogènics, teratogènics o mutagènics, i també poden desencadenar desordres de tipus hormonal o immunosupressor.

Les àmplies condicions mediambientals que permeten el creixement dels fongs comporten que les micotoxines es puguin produir en substrats molt diversos. En el cas del compost, els fongs podrien produir les micotoxines, passar així a la terra i als vegetals que se'n nodreixen i, d'aquesta manera, arribar a la cadena alimentària.

La majoria de les micotoxines estan produïdes per espècies dels gèneres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* i *Alternaria*. Les micotoxines més estudiades són les aflatoxines. Aquestes tenen una elevada toxicitat i una àmplia distribució. Formen una família de 16 compostos. Les aflatoxines B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>2</sub> i M<sub>1</sub> són les més localitzades en aliments i les de més toxicitat (Weidenbörner, 2001.).

L'Agència per a la recerca del Càncer (IARC) va classificar l'aflatoxina B<sub>1</sub> en el Grup 1 (IARC, 1987), considerant-la cancerígena per a l'home. Posteriorment, l'ocratoxina A es va classificar dins del Grup 2B (IARC, 1993) com a agent possiblement carcinogènic per a l'home. La mateixa agència, l'any 2002 va realitzar diferents estudis en els quals s'administraven mescles d'aflatoxines en animals experimentals. Es va concloure que hi havia evidències suficients per a considerar les aflatoxines B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> i M<sub>1</sub> cancerígenes per a animals.

Com a conseqüència de la toxicitat que suposen les micotoxines per a les salut humana i animal, molts països han establert reglaments en mode de lleis o bé de recomanacions per al seu control. L'any 2002 a Europa es va recomanar que es dugués a terme un programa coordinat de controls per a vigilar la freqüència d'aparició i concentració d'aflatoxines i ocratoxina A en productes destinats a l'alimentació animal.

Les espècies fúngiques més conegudes productores d'aflatoxines són l'*Aspergillus flavus* amb la producció de les aflatoxines B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub>; i *A. parasiticus*, que produeix les quatre aflatoxines B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>2</sub>. L'ocratoxina A pot ésser biosintetitzada per una gran varietat d'espècies fúngiques de *Penicillium* i *Aspergillus*.

Els mètodes d'anàlisi d'aquestes toxines no són senzills ja que es troben en matrius complexes i estan en concentracions baixes. La tècnica més usada per a les anàlisis d'aquests compostos ha sigut la cromatografia líquida amb diferents etapes de purificació segons la matriu i la concentració de toxina.

Fins a l'actualitat, la legislació sobre les aflatoxines només s'ha considerat en matrius alimentàries, en cap cas sobre compost ni sobre fangs de depuradores. En els darrers anys (Bloom *et al.*, 2007), s'han publicat estudis sobre els indicis de la formació de micotoxines durant el procés de compostatge com a conseqüència de la quantitat de fongs que s'hi desenvolupen.

L'estudi dels fongs que es poden desenvolupar durant el compostatge i la seva possible producció de toxines es considera d'interès per a la salut, això fa que l'estudi d'aquest fet sigui important. La presència de toxines resulta doblement preocupant per l'efecte que podrien tenir tant durant la producció del compost en plantes depuradores, com durant la seva aplicació com a adob en agricultura o en jardineria.

A part de la ingesta, existeixen altres fonts de contaminació per micotoxines, com per exemple la inhalació de pols de gra contaminat amb micotoxines. Com que les micotoxines no són substàncies volàtils, només existeix l'exposició per inhalació quan passen a l'aire part dels fongs o per part de les espores d'aquests.

Sobre la intoxicació per inhalació de micotoxines, se'n troben pocs casos definits. Un dels més rellevants es va donar a l'interior d'una casa on es van trobar nivells elevats de toxines (Previdi *et al.*, 1986). Per comprovar-ho, es van prendre mostres de l'aire de l'ambient que van revelar nivells elevats de nombroses espores fúngiques no habituals en edificis. També es van aïllar del material procedent de sostre i dels conductes de l'aire, micotoxines altament tòxiques.

Un altre cas d'intoxicació per inhalació de micotoxines és el dels treballadors d'una fàbrica de cotó al sud de Rússia, i el cas d'uns grangers que treballaven amb fenc florit (Croft *et al.*, 1986).

L'estudi sobre l'exposició d'aire contaminat per aflatoxines s'ha centrat en grangers i altres treballadors agrícoles. S'han analitzat mostres de la recol·lecció, del trasllat en cintes transportadores, de l'emmagatzematge i de la pols del gra de blat contaminat.

Els resultats obtinguts van demostrar l'existència del perill d'inhalar aflatoxines en la pols. A causa de la seva alta toxicitat, es van suggerir mesures de protecció per als treballadors (Gregg *et al.*, 2001). Un altre camp on preocupa l'exposició a la inhalació d'aire contaminat per aflatoxines i/o ocratoxina A és en les plantes de depuració d'aigües urbanes. En el procés de compostatge del fang de depuradora es creu que s'hi poden desenvolupar diferents gèneres de fongs i produir toxines.

Per tot el que s'ha plantejat fins ara, la present Tesi doctoral es pregunta si els fangs de depuradora, fins i tot compostats, es poden seguir aprofitant en l'agricultura com s'ha fet durant tots aquests anys ja que:

1.- Existeix la possibilitat que un fong productor de micotoxines pugui intervenir en el procés de compostatge i produir les toxines estudiades, causant així efectes perjudicials pels treballadors de les plantes de compostatge. Els treballadors podrien inhalar les micotoxines a través de la pols, de partícules i de les espores fúngiques. Aquesta via de contaminació també es podria donar en persones que manipulessin el compost contaminat.

2.-Les micotoxines s'han controlat en aliments, però actualment es planteja una altra via de contaminació que seria a través del compost. Aquest fet es podria donar perquè el compost s'utilitza com a adob en agricultura. Per tant, si l'adob conté les toxines, aquestes podrien arribar a les plantes i, a través de la cadena tròfica, a l'ésser humà. (*Déportes, et al.*, 1997).

En conseqüència, els objectius generals de la present tesi doctoral són:

1.-Determinar si el procés de compostatge permet la producció de les aflatoxines i l'OTA.

2.- Comprovar si el compost és un substrat adequat per a la producció d'aflatoxines.

I els objectius específics:

Aïllar i identificar els microfongs presents en les diferents etapes de producció del compost en les plantes de compostatge de Blanes i de Manresa, i estudiar la capacitat micotoxigènica dels fongs *Aspergillus* i *Penicillium* aïllats, mitjançant mètodes cromatogràfics.

Aïllar i identificar els microfongs presents en diferents tipus de compost procedent de residu sòlid urbà, procedent de femta de cavall i procedent de restes de deixalles casolanes, i estudiar la capacitat micotoxigènica dels fongs *Aspergillus* i *Penicillium* aïllats, mitjançant mètodes cromatogràfics.

Determinar el solvent d'extracció de les aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> i de l'ocratoxina A en compost, mitjançant una variació del mètode de la FDA.

Comprovar la producció d'aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> i d'ocratoxina A a partir de les soques *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 i *Aspergillus ochraceus* CECT 2948 sobre diferents substrats, arròs i compost.

Comprovar la capacitat micotoxigènica d'una soca sembrada primer sobre compost i després sembrada sobre arròs.

Estudiar la influència de la proporció arròs-compost en la producció de toxines produïdes pel fong *Aspergillus parasiticus* CECT 2681.

Estudiar la quantificació de toxines en arròs per UHPLC-UV i HPLC-DAD-MS per part de la soca de control *Aspergillus parasiticus* CECT 2681.



PART TEÒRICA.

---

## **2. 1. Fangs de depuradores urbanes.**

Avui en dia, el problema de depuració de les aigües residuals es troba pràcticament solucionat ja que existeixen tècniques de tractament destinades a obtenir uns afluents que es puguin abocar al medi natural sense que perjudiquin la salut dels animals i de les plantes. Sens dubte, però, no es pot parlar de depuració d'aigües sense tenir en compte els seus principals residus, els fangs de depuradora, ja que aquests s'han de gestionar de manera correcta per evitar problemes d'olors i de volum, a l'hora de ser transportats (Spinosa i Vesilind, 2001).

Els fangs de depuradora són un material heterogeni que es genera durant els processos de depuració d'aigües residuals. La seva composició depèn no només de l'origen de les aigües, sinó també de la tècnica de depuració d'aquestes, i del tractament que s'efectua al fang.

La problemàtica d'aquests biosòlids radica en el volum que se'n genera. Només a Catalunya, es preveu que l'any 2014 es produeixin 160.000 tones de fangs com a matèria seca (MS), un 5 % més que l'any 2007, de les quals un 43,7 % corresponen a les depuradores del Besòs i d'El Prat de Llobregat (ACA, 2006).

A aquest volum de biosòlids se'ls ha de donar un destí. Les dues possibilitats més contemplades són: dipositar-los en abocadors controlats, o bé realitzar amb ells posttractaments (compostatge o assecat tèrmic) que permetin bàsicament dues coses: la primera, obtenir nous residus revaloritzats destinats a finalitats agrícoles; i la segona, per a la recuperació de terrenys degradats. Si no s'utilitzen per a aquestes finalitats, es poden dipositar en abocadors, o incinerar-los (aquesta darrera, tanmateix, pot comportar problemes i un cert rebuig social).

### 2.1.1. Generació dels fangs de depuradora.

Els fangs de depuradora són un producte secundari resultant de la depuració de les aigües residuals. Els fangs s'obtenen a les Estacions Depuradores d'aigües Residuals (EDAR) després de la successió de tractaments primaris i secundari, que s'efectuen sobre les aigües residuals. Cada un dels processos consta de diferents operacions tal i com es mostra a la Figura 2.1. i com es descriu a continuació:

**Pretractament**, adequa les aigües residuals entrants a l'EDAR per a poder efectuar els tractaments posteriors. Es duen a terme un seguit d'operacions físiques i mecàniques que permeten l'eliminació d'objectes pesants, grava i greixos. Seguidament es realitza una posterior neutralització per assegurar que els tractaments que segueixen tinguin el pH necessari per funcionar. També s'ha de tenir en compte que les condicions siguin aeròbiques mitjançant un procés d'introducció d'aire. Els sòlids obtinguts després de la seqüència d'operacions no són considerats fangs i es recullen a part dels mateixos.

**Tractament primari**, aquest és un tractament que no es realitza sempre, és un procés de depuració físico-química de les aigües que procedeixen del pretractament. Per aconseguir un bon resultat es tracta de separar la matèria orgànica present a l'aigua mitjançant l'addició de substàncies coagulants que propicien la floculació d'aquesta. Aquests flòculs sedimenten al fons o bé es troben a la superfície després d'haver-se unit a les petites bombolles d'aire que s'injecten dins el tanc de tractament primari. A mesura que es produeixi la sedimentació i flotació del material, aquest es va retirant i constitueix el que s'anomena fang primari.

**Tractament secundari**, sotmet les aigües del tractament primari a un tractament biològic per descompondre una part de la matèria orgànica que contenen. Per fer-ho s'utilitzen microorganismes que es nodreixen de la matèria orgànica per a créixer. Les bactèries en qüestió poden actuar en condicions aeròbiques i anaeròbiques per la qual cosa pot ser necessari l'airejament forçat en el primer cas. Ambdues situacions produeixen grans flòculs de matèria en descomposició que són retirats a tancs de sedimentació. És d'aquesta manera que es generen els fangs secundaris que juntament amb els primaris formen els anomenats fangs mixtos altrament anomenats fangs de depuradora.

Com a conseqüència del seu gran volum i del seu potencial tòxic, no són aprofitables directament.

L'aigua resultant pot ser retornada al medi natural o bé reutilitzada. És per aquest fet que algunes EDAR realitzen el tractament terciari.

**Tractament terciari o avançat** s'anomenen d'aquesta manera tant els tractaments emprats per a l'eliminació dels nutrients presents a l'aigua, com els d'afinament. L'eliminació dels nutrients (nitrogen i fòsfor) pot ser biològica o físicoquímica.

L'eliminació biològica de nitrogen es duu a terme via nitrificació-desnitrificació, aquesta opció és àmpliament utilitzada per a l'eliminació de l'amoni present a les aigües residuals.

La nitrificació és un procés aerobi i la duen a terme bacteris nitrificants autòtrofs, aquests oxiden l'amoni a nitrit i seguidament el nitrit a nitrat gràcies a la presència d'oxigen dissolt. Posteriorment el nitrit i/o nitrat es redueixen a nitrogen gas, que s'allibera a l'atmosfera.

El procés anòxic de desnitrificació, es dut a terme per bacteris heteròtrofs desnitrificants que utilitzen com a font d'electrons la matèria orgànica.

El procés d'eliminació de fòsfor en una EDAR, és lleugerament diferent, es pot fer biològicament mitjançant organismes acumuladors de polifosfats (PAO, de l'anglès *Phosphorus Accumulator Organisms*) o físicament i química gràcies a l'addició de diferents reactius químics que, al formar precipitats juntament amb el fòsfor, provoquen la disminució d'aquest en l'efluent de sortida. Tradicionalment, els agents químics més emprats en el camp de la desfosfatació han estat el sulfat d'alumini ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ), el clorur fèrric ( $\text{FeCl}_3$ ) i el policlorur d'alumini (PAC) (Dapena-Mora *et al.*, 2006).

El procés d'eliminació biològica de fòsfor requereix l'alternança de condicions anaeròbies i aeròbies per afavorir el desenvolupament dels organismes acumuladors de fòsfor. Aquests organismes són capaços d'assimilar fòsfor en quantitats superiors als requisits nutricionals, el que permet com en el cas anterior, efluent amb baixes concentracions d'aquest element.

Els bacteris PAO en condicions anaeròbies capten àcids grassos volàtils (AGV) especialment acetat (Marais *et al.*, 1983; Comeau *et al.*, 1986) i ho emmagatzemen de forma intracel·lular.

En condicions aeròbies, els bacteris PAO utilitzen el substrat emmagatzemat com a font d'energia i de carboni pel seu propi creixement i per acumular fòsfor intracel·lular en quantitats majors a les obtingudes en condicions anaeròbies, recuperant d'aquesta forma les seves reserves de polifosfat i donant lloc a una eliminació neta (Dapena-Mora *et al.*, 2006).

El fòsfor surt del sistema amb la purga del fang que es realitza després de l'etapa aeròbia. Aquest procés cíclic permet una eliminació de fòsfor superior a la deguda únicament a la síntesi cel·lular dels bacteris heteròtrofs no acumuladors.

Els tractaments terciaris, com ja s'ha comentat, també es refereixen als processos de desinfecció per a eliminar microorganismes patògens de l'aigua, o altres tractaments posteriors per a afavorir la reutilització de l'aigua depurada per a usos secundaris (agrícoles, de procés, etc.). Així, hi ha diversos tractaments segons l'objectiu, però el més habitual és el de la higienització destinada a eliminar la presència de virus i gèrmens de l'aigua (cloració, làmpades UV, etc.).

Existeixen diferents factors que poden fer variar les característiques i les qualitats dels fangs, com per exemple, la composició de les aigües residuals, el tipus de tractament utilitzat per a tractar els fangs i en una mateixa EDAR, les característiques dels fangs poden variar anualment, segons l'estació de l'any i inclús diàriament segons les característiques de les aigües entrants ([www.epa.gov](http://www.epa.gov)).

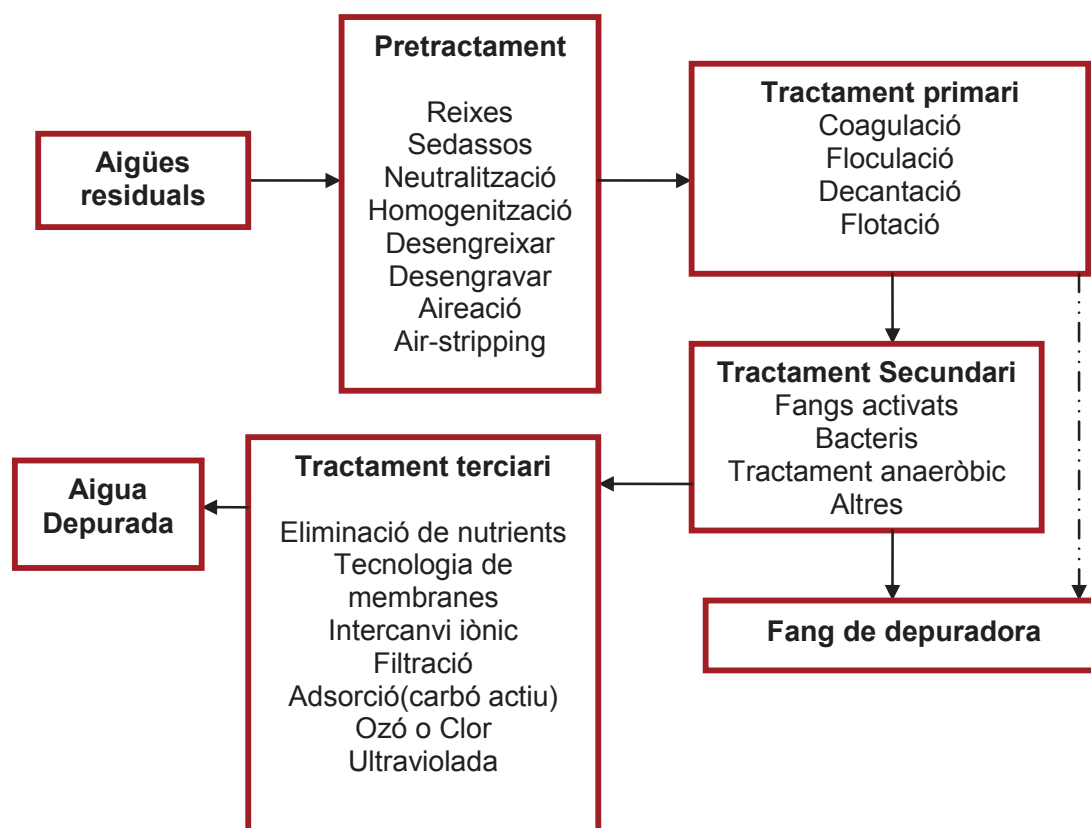


Figura 2.1. Seqüència de tractaments que reben les aigües

### 2.1.2. Tractament dels fangs de depuradora.

Els tractaments que es realitzen als fangs són bàsicament per complir els requeriments de protecció de la salut humana, la dels animals, l'ambiental, per facilitar la seva manipulació i per reduir les despeses de transport. La protecció cap a la salut humana i ambiental es realitza efectuant un seguit de controls sobre uns paràmetres establerts per la legislació com poden ser la concentració de metalls pesants i la càrrega de microorganismes. Les millores pel que fa al transport i a la manipulació s'aconsegueixen en la seva major part reduint el contingut en aigua i el volum de sòlids que s'obtenen en el tractament dels fangs.

A la Figura 2.2. es mostra l'esquema del procés de tractament dels fangs de depuradora per transformar-se en fang deshidratat i també els seus tractaments posteriors.

Les etapes més habituals per les que passen els fangs de depuradora en el seu tractament, són les que es descriuen a continuació:

- **Concentració**, etapa que consisteix en eliminar el màxim d'aigua possible dels fangs i homogeneïtzar-los. És pot realitzar mitjançant una decantació o bé netejant el fang amb aigua clara i fent-la circular contínuament (elutriació). D'aquesta manera, s'aconsegueix homogeneïtzar el fang i augmentar la concentració de sòlids des de l'1% a un 3-8% en pes.
- **Estabilització**, l'objectiu principal d'aquesta etapa és disminuir el contingut de la matèria orgànica present dins dels fangs. És pot dur a terme de manera aeròbica o bé anaeròbica. La **digestió aeròbica** es basa en la respiració endògena dels microorganismes, que al no haver-hi aportació externa de nutrients, han de consumir els propis fangs. Aquesta digestió es realitza en cubes obertes a 20°C durant 15 dies. S'aconsegueix una disminució del 30 al 40% en pes de matèria orgànica. La **digestió anaeròbica** es basa en un procés fermentatiu en un medi on la concentració d'oxigen és baixa o nul·la, la matèria orgànica es descompon en compostos més simples que serveixen d'aliment als arqueus metanogènics (molt sensibles al pH i a la temperatura), aquestes en una segona fase, converteixen aquests compostos en diòxid de carboni i metà, el qual pot ser recuperat i utilitzat per generar energia.

La digestió anaeròbica es realitza a 35°C (mesofílica) i també pot dur-se a terme a temperatures de més de 55°C (termofílica) si es vol reduir encara més els sòlids i el contingut en patògens. La digestió anaeròbica és el procés d'estabilització més corrent i aplicat en més del 50% de fangs produïts a Europa (Thornton i Herrero ,2010). Aquesta digestió és habitual a les plantes de tractament grans, pel seu potencial a l'hora d'obtenir metà. Entre els seus avantatges es troben el seu baix cost energètic (Suh i Rousseaux, 2002) i la forta reducció del volum final de fangs.

- **Deshidratació**, aquesta etapa està destinada a eliminar bona part de l'aigua dels fangs, ja que aquests tenen encara una consistència líquida. Durant aquesta etapa, els fangs són condicionats i espessits.

El primer procés es realitza mitjançant l'adició de compostos químics (clorur de ferro, calç o polímers) que faciliten l'agregació de les partícules petites en altres de més grans. L'espessiment elimina part de l'aigua unida a les partícules. Els mètodes més habituals són sistemes mecànics (mitjançant filtres de buit, premses i o centrífugues). Al final del procés, s'obté un material amb un contingut en matèria seca d'entre el 20-45 %.

La deshidratació és un procés necessari abans de qualsevol posttractament (assecat tèrmic, compostatge) o ús (incineració, aplicació a sòls). Cal destacar que per a la incineració, el fang ha d'haver estat assecat prèviament.

La deshidratació facilita la manipulació dels fangs ja que converteix un material líquid en un sòlid pastós. D'aquesta manera es redueixen les despeses de transport com a conseqüència de la disminució de pes i volum.



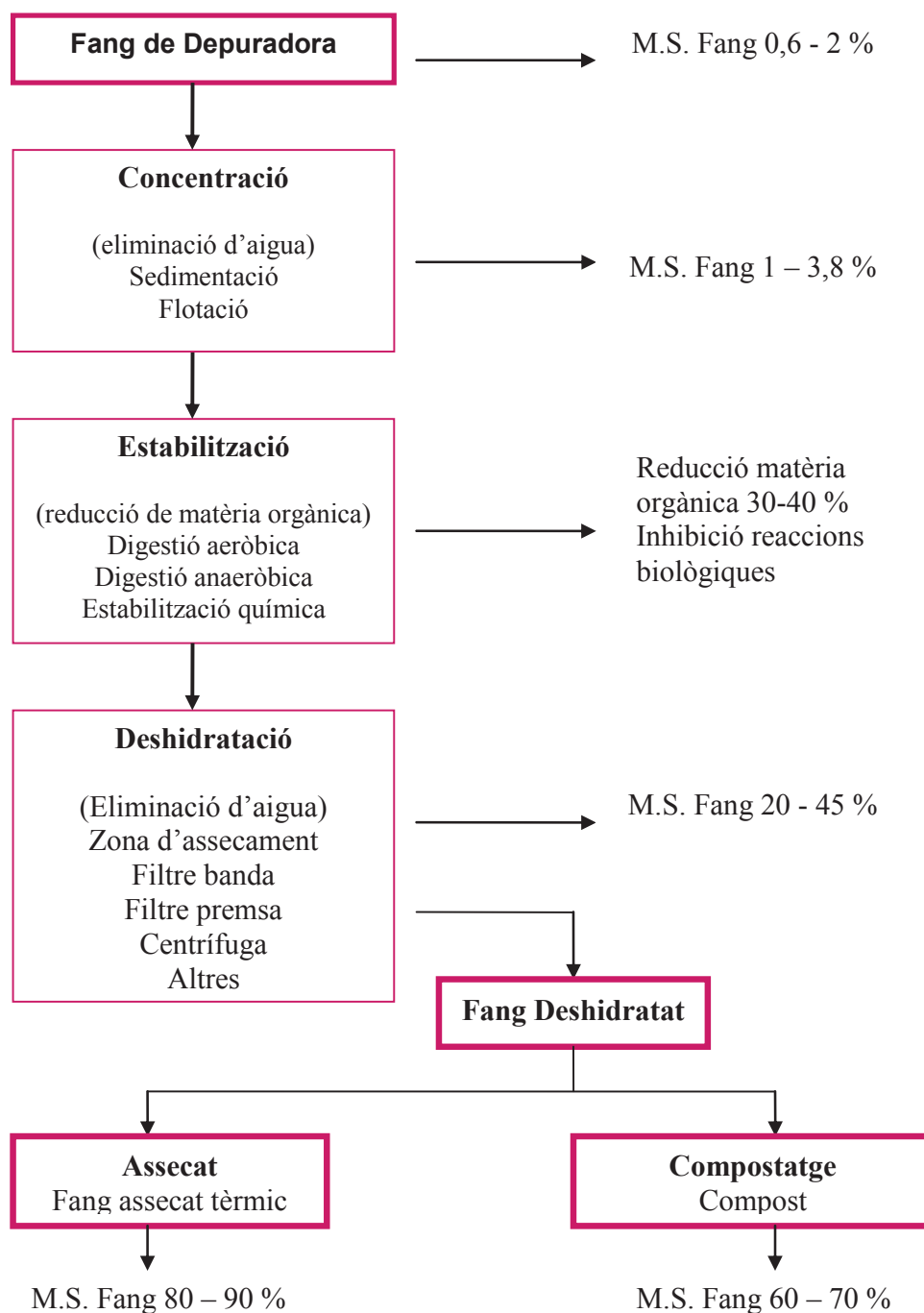


Figura 2.2. Tractament i posttractament del fang de depuradora (M. S: Matèria Seca)

### **2.1.3. Posttractament dels fangs de depuradora.**

Com a conseqüència de l'olor que desprenen i a la seva estructura pastosa, els fangs de depuradora solen rebre majoritàriament un posttractament a les mateixes EDAR. Els posttractaments poden ser els següents: Compostatge i o Assecament tèrmic. Ambdós tenen com a objectiu principal aconseguir una millor aplicació i manipulació dels fangs disminuint-ne el volum i eliminant-ne les olors.

Aquests dos tipus de posttractaments, s'apliquen sobre el fang deshidratat i originen dos tipus de subproductes (fang assecat tèrmicament i compost) que contenen menys quantitat d'aigua i alhora és redueixen els costos de transport. En segon lloc, l'aspecte visual del producte millora respecte el fang deshidratat ja que el color que tenen és semblant al de la terra. Aquest fet, junt amb la disminució de l'olor que es desprèn fa que no existeixi el rebuig social que produïa l'aplicació directa del fang.

#### **2.1.3.1. Assecament tèrmic.**

L'assecat tèrmic és una operació física que afavoreix l'estabilització del fang destruint els patògens i eliminant el contingut en aigua, quedant per sota del 10% ([www.enviroconsult.fr](http://www.enviroconsult.fr)). La realització d'aquest procés necessita temperatures elevades que s'aconsegueixen gràcies a tecnologies que aprofiten el calor i els gasos produïts durant la digestió anaeròbica dels fangs deshidratats, utilitzant-los com a combustible.

L'estabilització que produeix l'assecat tèrmic permet la disminució de les males olors, l'emmagatzemament del fang durant llargs períodes de temps, també la seva valoració com a fertilitzant i com a combustible ecològic.

Durant el procés d'assecat tèrmic, és duu a terme la pèrdua de quatre tipus d'aigua possibles: lliure, capil·lar, intracel·lular i molecular. L'aigua lliure s'elimina per sedimentació o bé per centrifugació en el procés d'assecat igual que la capil·lar.

La intracel·lular i la molecular requereixen molta més energia que les anteriors per ser eliminades, al final del procés, el producte sec conté entre un 1 – 3 % d'aigua.

### 2.1.3.2. Compostatge dels fangs de depuradora.

El procés de compostatge consisteix en la descomposició de la matèria orgànica en presència d'oxigen (fang deshidratat + agent estructural), causada per l'acció de microorganismes que descomponen els residus orgànics. Aquest procés exotèrmic genera aigua, diòxid de carboni, residu i compost.

El compost utilitzat com a adob organomineral pot millorar la fertilitat del sòl, és per això que segons les característiques que tingui, les plantes sembrades que creixin sobre el sòl, disposaran dels elements nutritius que necessitin per desenvolupar-se, així mateix les seves arrels, tindran unes condicions de desenvolupament favorables: bona circulació de l'aire, aigua i la presència de microorganismes. La disponibilitat d'elements minerals i d'aigua depèn bàsicament de dos factors: el primer factor fa referència a la capacitat que té el complex argilo húmic (associació d'argiles i de matèria orgànica) d'emmagatzemar i alliberar aigua, nitrogen i minerals (calci, potassi, fòsfor, ferro, oligoelements), el segon factor del qual depèn, és de l'activitat dels microorganismes del sòl (bacteris i fongs) que transformen la matèria orgànica en elements assimilables per la planta.

Perquè es doni l'existència d'un complex argilo húmic equilibrat (en relació amb les necessitats de les plantes) i de microorganismes actius i diversificats, s'han de donar les condicions següents:

- Una circulació d'aire i d'aigua satisfactòria per aconseguir una estructura adequada.
- Un nivell de matèria orgànica elevat.
- L'absència o la presència limitada d'elements tòxics per a les arrels i els microorganismes (fungicides, metalls pesants, sals).
- L'absència d'escolament o d'erosió ja que això s'endú els elements com argiles i matèries orgàniques constituents del complex argilo húmic ocasionant la destrucció de l'estructura del sòl: fenòmens d'encrostant, compactació, carències i asfíxies.

El procés de compostatge comença amb la **preparació de la mescla** entre fangs deshidratats i un agent estructurant (com encenalls de fusta, restes de poda, pellofes d'arròs, palla, etc.) que dóna la porositat necessària per mantenir les condicions aeròbiques durant el temps que dura el compostatge a la vegada que disminueix el contingut en humitat dels fangs per absorció d'aigua. També dóna una relació C/N adequada.

Seguidament té lloc la **primera fase del compostatge** que dura entre dues i tres setmanes. Aquest procés es pot realitzar de tres maneres diferents, en pila, en pila estàtica airejada i en túnel. En el primer dels casos, la mescla és col·locada en piles de forma allargada i exposades a l'aire. Les piles es remouen amb una voltejadora per assegurar l'entrada d'oxigen dins la mescla, controlar que la humitat no disminueixi en excés i que la temperatura arribi als 55°C en tota la pila, per així destruir els patògens.

Les piles estàtiques airejades són de forma rectangular, l'aire hi és injectat a partir de tubs perforats a la base de la pila. En últim cas, en el compostatge dins del túnel, els nivells d'oxigen poden ser estrictament controlats. També permet el control de la velocitat del procés i de l'entrada i sortida de l'aire, així es tracten i s'eliminen els mals olors.

En aquesta fase del compostatge, la descomposició de la matèria orgànica és funció de la temperatura. A l'inici del compostatge, (període mesofílic), la matèria orgànica està a temperatura ambient i els microorganismes mesòfils es multipliquen ràpidament. Com a conseqüència de l'activitat metabòlica, la temperatura s'eleva i es formen àcids orgànics que fan disminuir el pH. Quan s'arriba a una temperatura de 40°C (període termòfil), els microorganismes termòfils actuen transformant el nitrogen en amoníac i el pH del medi es fa alcalí. A partir dels 60°C aquests fongs termòfils desapareixen i es desenvolupen les bacteries esporígens i els actinomicets.

Aquests organismes s'encarreguen de descompondre les ceres, proteïnes i hemicel·luloses. Al final d'aquesta fase la temperatura comença a baixar (període de refredament). Quan la temperatura és menor de 60°C, reapareixen els fongs termòfils que envaeixen el compost i destrueixen la cel·lulosa. Al baixar de 40°C els mesòfils també reincideixen en la seva activitat i el pH del medi disminueix lleugerament.

Acabada aquesta primera fase del compostatge, comença l'etapa de **maduració**. La mescla compostada es trasllada a uns departaments exteriors on hi romandrà tres mesos en forma de pila, a temperatura ambient. Mitjançant acció mecànica es fa voltar la mescla i la humitat es controla a través de l'adició d'aigua quan és necessari.

En aquesta fase tindrà lloc una descomposició lenta on es produiran reaccions secundàries de condensació i polimerització de l'humus.

Al final del procés de compostatge, el volum del fang pot haver arribat a reduccions del 50% en volum i fins un 40% en pes.

Contràriament però, la concentració de la matèria orgànica en contaminants que no siguin biodegradables haurà augmentat com a conseqüència de la falta de degradació a expenses de la disminució de la matèria en la qual es troben. És per això que és important conèixer la qualitat del fang de partida ja que la qualitat del compost disminuirà com més contaminants contingui i com més tòxics siguin. Si la qualitat del compost és l'adequada, aquest presentarà molts avantatges sobre el fang deshidratat per a poder ser aplicat al sòl.

#### **2.1.3.3. Compostatge casolà.**

La fracció orgànica de les escombraries està constituïda per aquell conjunt de materials residuals que tenen el seu origen en els éssers vius, tant animals com vegetals, pells de fruites, restes de verdures, despulles animals, aliments que s'han fet malbé, restes de menjar no consumit, esporgues, fulles i flors seques, etc.

La xarxa europea de compostatge (European Compost Network) recomana sempre que sigui possible que cadascú es faci el seu propi compost. Si no és possible, com més propera sigui la planta de compostatge millor.

El compostatge casolà és un procés simple que mitjançant un senzill aprenentatge es pot realitzar al mateix lloc on s'ha generat la matèria orgànica. El que es necessita és un espai amb sòl natural, si pot ser a l'ombra o bé un recipient especial anomenat compostador.

Un compostador té els següents avantatges: les temperatures altes es mantenen millor i així el procés pot desenvolupar-se més ràpidament, també redueix notablement les pèrdues d'humitat.

La primera capa de la pila ha de ser de restes vegetals, per facilitar que l'aire pugui circular per la pila. A partir d'aquí es poden anar fent capes a mesura que es generin residus orgànics, intercalant les capes de matèria orgànica amb capes de restes vegetals.

Periòdicament cal remoure, per assegurar que el procés tingui l'oxigen suficient. Si el material fa olor o està massa sec, s'ha de voltejar més sovint en el primer cas o humectar en el segon.

En aquest procés de compostatge, igual com en l'esmentat a l'apartat 2.1.3.2, són essencials els microorganismes com els fongs i bacteris, per tant, tots aquells factors que puguin limitar-ne la vida i desenvolupament ho seran també del procés.

#### **2.1.3.4. Compostatge orgànic procedent de fems de cavall.**

En l'actualitat, la gestió de les explotacions ramaderes, requereix assumir criteris, mediambientals pel que fa als excrements dels animals. L'aprofitament del residu dels excrements per transformar-lo en un producte de valor afegit (compost), en aplicacions agrícoles, es presenta com una alternativa des de el punt de vista ambiental i econòmic, pel reduït cost de les instal·lacions necessàries i relativa senzillesa del tractament.

A més, la valorització que les explotacions agràries fan dels excrements permet reduir l'impacte negatiu d'aquests residus sobre el medi ambient.

El compostatge de fems de cavall, tracta conjuntament els fems provinents de la ramaderia amb els restes de poda i palla de l'agricultura, aquests últims elements s'utilitzen com estructurants per al procés de compostatge. Els agents estructurants proporcionen la porositat necessària per tal de dur a terme el procés de compostatge. (Arco i Romanyà, 2012).

#### **2.1.3.5. Compostatge procedent de Residu Sòlid Urbà orgànic (CESPA).**

A Catalunya es produeixen cada any més de 30 milions de tones de residus de diferents tipus, relacionats amb les diferents activitats que s'hi desenvolupen: la mineria, l'explotació forestal i agrícola, les indústries, la construcció, la depuració d'aigües, els serveis, o senzillament, la vida quotidiana de qualsevol persona. Els Residus Sòlids Urbans són aquells que es generen en domicilis particulars, comerços, oficines i serveis, així com el residu que no tingui la qualificació de perillós i que per la seva naturalesa o composició pot assimilar-se al produït en els llocs o activitats anteriors (neteja de la via pública, zones verdes, animals domèstics morts, residus i runes procedents d'obres menors de la construcció. (Mancomunitat la Plana, 2006).

Dins dels residus sòlids urbans s'hi inclouen els residus sòlids urbans orgànics, aquests provenen dels fangs de les depuradores d'aigües residuals i de la fracció orgànica de les escombraries.

Existeixen moltes formes de tractar els residus sòlids urbans orgànics i el compostatge n'és una.

### 2.1.3.6. Factors que condicionen el procés de compostatge.

L'acció de la descomposició de qualsevol dels tipus de compost que s' han esmentat en els apartats anteriors recau sobre l'activitat dels microorganismes que l' utilitzen com a substrat. Per tal què els microorganismes realitzin aquestes funcions, és necessiten unes condicions de temperatura, humitat i oxigenació òptimes. Els grups principals de microorganismes que intervenen en aquesta descomposició són els bacteris, destacant els actinomicets, i els fongs.

Els factors més importants per a poder realitzar el procés són:

- **Temperatura:** Les temperatures òptimes per eliminar alguns patògens, paràsits i llavors de males herbes es troben dins l'interval de 35-55°C. A temperatures més elevades, els microorganismes que interessen per la degradació es moren i d'altres no actuen. Si s'assoleixen temperatures majors a 60°C o més, l'activitat microbiana es pot inhibir o fins i tot aturar.

En aquest cas, el refredament posterior podria permetre de nou la proliferació de microorganismes. Durant el procés de compostatge la proporció de microorganismes i la temperatura evolucionen amb el temps tal com es mostra a la Figura 2.3.

- **Humitat:** Durant el procés de compostatge és important que la humitat se situï entre un 40-60%. Si el contingut en humitat és major, l'aigua ocuparà tots els porus i el procés es tornarà anaeròbic, es a dir, es produirà una putrefacció de la matèria orgànica. Si la humitat es baixa, l'activitat dels microorganismes és més lenta i, per tant, el procés de compostatge s'alenteix.
- **pH:** El pH neutre o bé pròxim a aquest assegura el desenvolupament dels processos fisiològics bacterians. Valors de pH inferiors, inhibeixen aquest desenvolupament. Els valors majors de 8 inhibeixen el creixement causant la precipitació de nutrients essencials en el medi, de forma que no són accessibles pels microorganismes.



- **Oxigen:** La presència d'aquest element és necessari en el procés de compostatge ja que aquest és aeròbic. La quantitat d'oxigen dependrà del material, textura, humitat, etc.
- **Relació C/N equilibrada:** Per obtenir un compost de qualitat és necessari que la relació carboni/nitrogen sigui equilibrada ja que aquests dos elements són els principals constituents de la matèria orgànica. La relació C/N adequada és de 25-35 / 1, aquesta variarà en funció de la matèria primera.

Una relació C/N molt elevada, disminueix l'activitat biològica. Una C/N molt baixa no afecta el procés de compostatge, perdent l'excés de Nitrogen en forma d'amoniac. Els materials rics en carboni i pobres en nitrogen són la palla, les fulles, les branques d'arbres, entre d'altres. Els rics en carboni i pobres en nitrogen són els vegetals joves, els excrements dels animals i els residus dels l'escorxadors.

En resum, les condicions òptimes per dur a terme un bon procés de compostatge són les següents: Humitat: 45-55%, temperatura: 45-60°C, oxigen: 15-21% i relació C/N: 25-35 / 1.

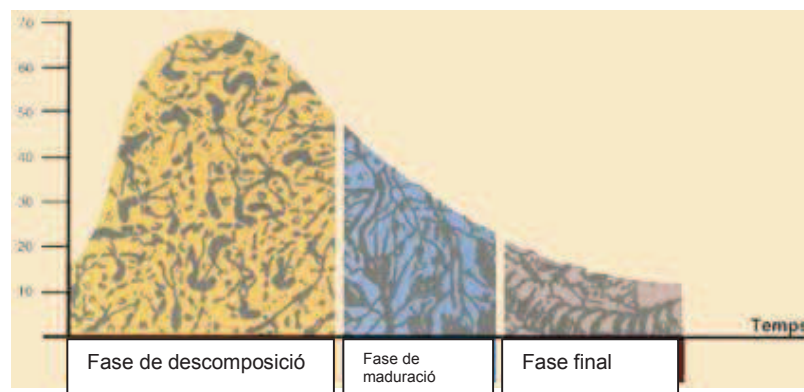


Figura 2.3. Evolució de la temperatura i la proporció de microorganismes al llarg d'un procés de compostatge. Font: Guia del compostatge dels recursos orgànics produïts a les llars, 2006.

## 2.2. Origen de les aflatoxines i ocratoxines.

Les aflatoxines van ser descobertes l'any 1960 quan més de cent mil galls dindis d'Anglaterra van morir a causa de la ingestió de farina de cacauet en mal estat. Aquesta farina era procedent del Brasil i estava contaminada amb fongs, concretament amb *Aspergillus flavus* (Lancaster *et al.*, 1961).

Per tal de demostrar que les aflatoxines produïdes per *Aspergillus flavus* eren la causa de la mort dels indiot, es va procedir a cultivar *Aspergillus flavus* sobre farina de cacauet. Un cop el fong s' havia desenvolupat, es va procedir a realitzar una extracció dels metabòlits formats amb cloroform.

L'extracte clorofòrmic obtingut, va ser dispensat a diferents animals, comprovant-se que provocava la malaltia. Es va demostrar també que l'extracte produïa una taca fluorescent blava al ser observada en paper cromatogràfic sota llum UV (Sargeant *et al.*, 1961).

Posteriorment, es va veure que la taca blava al ser cromatografiada sobre una placa de sílica gel i observada sota la llum UV es dividia en quatre subtaques, dues de les quals representaven una fluorescència verda (green) que es van designar amb els noms d'aflatoxina G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub> i, les altres dues es van designar com aflatoxina B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> ja que mostraven una fluorescència blava (blue) (Nesbitt *et al.*, 1962).

La paraula aflatoxina prové del mot anglès *aflatoxins* i és un acrònim d'**A**sp<sup>er</sup>gill<sup>us</sup> **f**lav<sup>us</sup> **t**ox<sup>ins</sup>.

Les ocratoxines van ser aïllades per primera vegada de l'*Aspergillus ochraceus* l'any 1965 fruit d' un estudi de laboratori de fongs toxigènics aïllats de cereals i llegums de Sud Àfrica (van der Merwe, 1965a).

Es van detectar tres toxines, la més abundant de les quals és l'Ocratoxina A, i les dues restants, menys abundants i de menor toxicitat designades com a Ocratoxina B i C (van der Merwe, 1965b).

Al cap dels anys, concretament l'any 1956, es va relacionar l'Ocratoxina A amb l'aparició d'una greu nefropatia endèmica a la regió dels balcans, (Bulgària, Romania i la desapareguda Iugoslàvia) atribuïda al consum de carns fumades que havien estat emmagatzemades en males condicions.

L'origen de la paraula ocratoxina està en el color ocre desenvolupat pel fong productor de toxina.

La legislació de micotoxines en aliments destinats al consum humà és molt estricta, establint un màxim de 10 µg/Kg de la suma de les aflatoxines B1, B2, G1, G2 i un contingut màxim en B1 de 5 µg/kg (Real Decreto 475/1988, de 13 de Mayo de 1988) en canvi el seu contingut en compost no està legislat. Per altra banda, quan s'evalua la qualitat ambiental d'un compost tampoc no es consideren les ufc fúngiques. Tanmateix si que es consideren les ufc bacterianes de coliformes totals i fecals, *E.coli*, *Enterococcus*, *Clostridium* i Enterobacteries en general. (Breure, 2004).

### 2.2.1. Naturalesa i propietats químiques de les aflatoxines.

Les aflatoxines formen part d'una família de compostos derivats de la difuranocumarina. Se n'han descrit fins al moment 16 tipus, de les quals les més freqüents en aliments són l'aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), aflatoxina G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), aflatoxina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>) i aflatoxina G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>). A continuació és mostra l'estructura química de les aflatoxines més comuns (Figura 2.4).

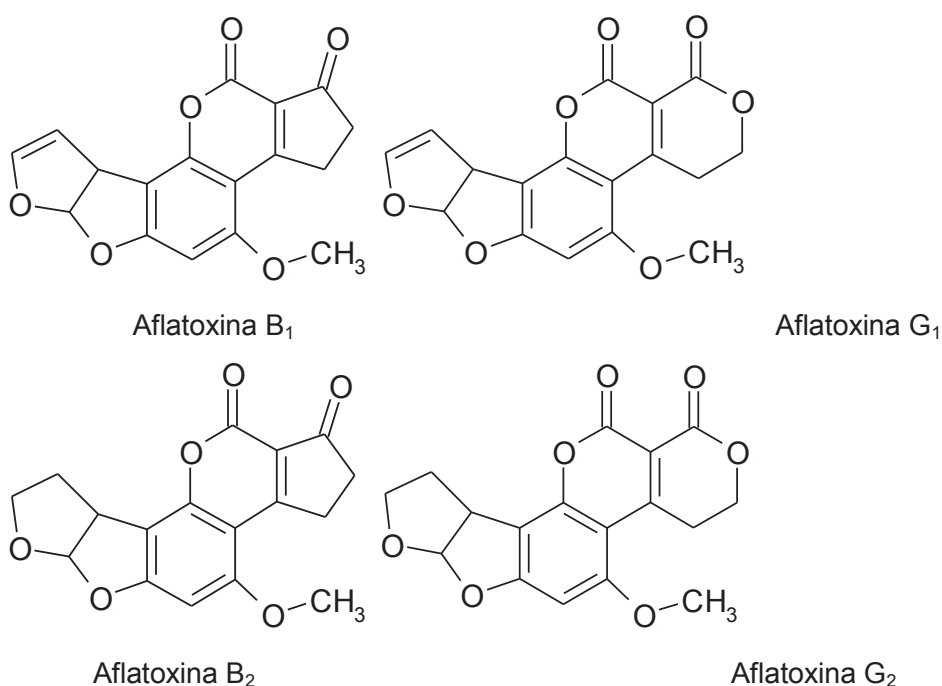


Figura 2.4. Estructura química de les aflatoxines B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>2</sub>

Les aflatoxines B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> al ser ingerides per animals productors de llet, són metabolitzades per enzims hepàtics de l'organisme que provoquen una hidroxilació per produir les respectives aflatoxines M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) i M<sub>2</sub> (AFM<sub>2</sub>) (Figura 2.5). Si el bestiar consumeix pinso contaminat amb aflatoxines, aquestes són eliminades a través de la llet i persisteixen en els productes làctics derivats (de longh *et al.*, 1964).

La quantitat d'aflatoxina  $M_1$  biosintetitzada es proporcional a la quantitat de toxina  $B_1$  ingerida. La taxa de conversió de l' $AFB_1$  en  $AFM_1$  oscil·la entre 0.4 i el 3% segons diversos autors, encara que generalment s'accepta una taxa mitjana pròxima a l'1% (Stolff, 1980).

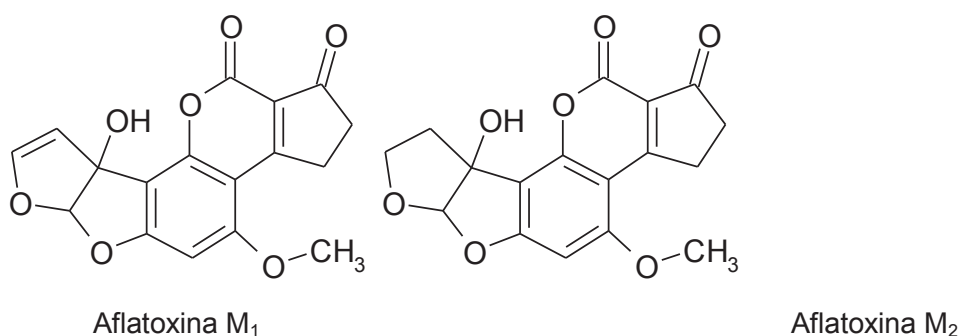


Figura 2.5. Estructura química de les aflatoxines  $M_1$  i  $M_2$

### 2.2.2. Naturalesa i propietats químiques de les ocratoxines.

Les ocratoxines formen una família de compostos més reduïda que la de les aflatoxines, està formada per les ocratoxines A, B, C. La més tòxica és l'ocratoxina A (OTA), d'aquí l'interès que ha despertat la seva determinació en els darrers anys.

La molècula d'OTA conté una porció d'isocumarí lligat a través d'un grup carboxílic a la L-fenilalanina mitjançant un enllaç amido (Figura 2.6).



Figura 2.6. Estructura química de l'ocratoxina A.

L'ocratoxina B és l'anàleg de clorat, l'ocratoxina C és l'anàleg éster metílic. La hidròlisi de les ocratoxines dona l'àcid carboxílic d'isocumarí (ocratoxina  $\alpha$ ) i el seu anàleg de clorat (Ocratoxina  $\beta$ ), els quals no són tòxics (Kuiper-Goodman i Scout, 1989) (Figura 2.7).

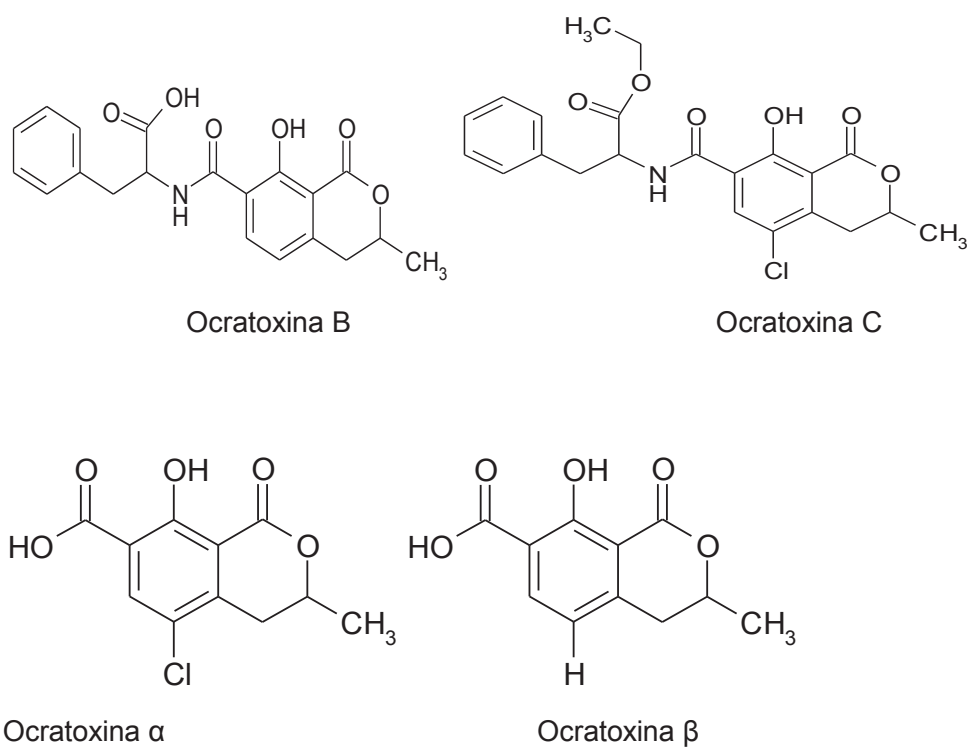


Figura 2.7. Estructura química de les ocratoxines B, C,  $\alpha$  i  $\beta$ .

### 2.3. Fongs productors de toxines.

Des de la segona meitat del segle 20 es tenen evidències que alguns fongs habituals en l'ambient poden elaborar les aflatoxines. L'any 1891 a Japó, Sakaki, va demostrar que l'extracte d'etanol procedent del fong que contaminava l'arròs, anomenat "arròs groc", resultava letal per als gossos, porcs i conills, ja que se'ls paralitzava el sistema nerviós central (Ueno i Ueno, 1972). Com a conseqüència d'aquest fet, la venda d'arròs es va prohibir al Japó l'any 1910.

L'any 1913, es va demostrar que un extracte de *Penicillium puberulum* aïllat de blat florit procedent de Nebraska, era tòxic si s'administrava a animals en una concentració de 200 a 300 mg/Kg de pes corporal (Alsberg i Black, 1913); es va convertir doncs en la primera evidència del cultiu de fongs sobre un medi de cultiu, en aquest cas l'arròs.

#### 2.3.1. Gènere *Aspergillus*.

*Aspergillus* és un gènere de fong que compta amb una gran varietat d'espècies fúngiques capaces de produir una gran diversitat de micotoxines. En els darrers anys els estudis s'han centrat en la producció de les aflatoxines. Les diferents espècies d'*Aspergillus* han despertat interès bé per la seva capacitat de produir metabòlits tòxics, pel paper que juguen amb la fermentació de productes orientals, o per la seva aplicació industrial per la producció d'àcids orgànics i/o enzims. L'existència d'espècies d'*Aspergillus* toxigèniques implica que sigui de vital importància la seva correcta identificació.

##### 2.3.1.1. Taxonomia del gènere *Aspergillus*.

El gènere *Aspergillus* conté més de 100 espècies reconegudes. En el nostre país, se'n poden trobar unes 25, aquestes creixen bé en les condicions del laboratori i es desenvolupen generalment de forma ràpida en els medis de cultiu. Per a la seva correcta identificació s'han d'incubar a una temperatura de 27-28°C durant un temps que oscil·la de 7 a 10 dies. Quan el medi de cultiu utilitzat és PDA, les colònies d'*Aspergillus* poden presentar diferents tonalitats: blanquinoses, grogues, marró - grogues, negres i diferents verds.

La morfologia microscòpica de les diferents colònies també és important degut a la seva diversitat sent aquesta una eina per a poder realitzar una correcta identificació de les espècies. Generalment, les espècies del gènere *Aspergillus*, tenen uns conidiòfors erectes que acaben amb una característica dilatació globosa o claviforme (la vesícula) que, per tota la superfície o només a la part parcial, porta fiàlids productors de conidis, o bé, en moltes espècies, porta cèl·lules anomenades mètules, sobre les quals neixen els fiàlids. Els fiàlids (estructures productores de conidis) poden créixer directament de la vesícula. S'anomenen uniseriats o bé créixer a partir de cèl·lules denominades mètules, anomenant-se biseriats.

La vesícula, els fiàlids i les mètules, si existeixen, formen el que s' anomena cap conidial, juntament amb els conidis que s'originen a partir dels fiàlids. Els conidis originen cadenes que poden ser compactes, anomenades columnars, o bé divergents. Les cadenes divergents donen lloc a caps conidials radials, que al madurar, en algunes espècies donen lloc a formes divergents o rosetons característics.

Els conidis són unicel·lulars de mida variable, són generalment hialins o lleugerament pigmentats, en massa, prenen colors variats: verd de diverses tonalitats, ocre, negre, crema, blanc.



Les espècies d'*Aspergillus* són més fàcilment identificables que les espècies de *Penicillium* a partir del color que desenvolupen els conidis. El color és un punt molt útil a l'hora de realitzar la identificació (Samson *et al.*, 2000) (Figura 2.8).

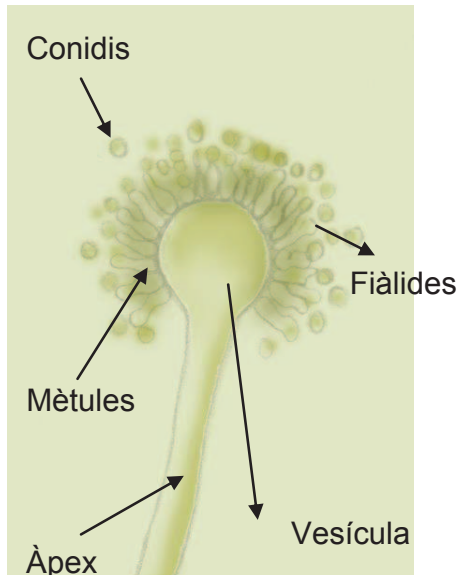


Figura 2.8. Característiques morfològiques microscòpiques del gènere *Aspergillus*.

#### 2.3.1.2. Micotoxines del gènere *Aspergillus*.

Moltes de les micotoxines produïdes pel gènere *Aspergillus* són comunes amb altres produïdes pel gènere *Penicillium*. És per això que moltes de les observacions que es fan per les toxines procedents d'*Aspergillus*, també es poden fer per les produïdes per *Penicillium*.

Es coneixen unes 50 espècies d'*Aspergillus* capaces de produir metabòlits tòxics, però les micotoxines d'*Aspergillus* més freqüents en aliments són les aflatoxines, l'àcid ciclopiazònic, la citrinina, la patulina i l'àcid penicílic.

### 2.3.2. Gènere *Penicillium*.

Es coneixen més de 150 espècies del gènere *Penicillium* (Pitt, 1988), de les quals 50 poden créixer i esporular bé en medis sintètics. El nom prové de l'aspecte de pinzell dels seus conidiòfors (del llatí *penicillum*, pinzellet).

#### 2.3.2.1. Taxonomia del gènere *Penicillium*.

Les colònies de *Penicillium* es desenvolupen de forma ràpida tot i que la seva identificació es força complicada i cal realitzar-la en condicions perfectament estandarditzades de medi de cultiu, temps i temperatura d'incubació. Els aspectes macroscòpics, de mida i color de colònies, color dels conidis i dels pigments s'utilitzen per distingir-los a nivell d'espècie (Pitt, 1988). Es però la textura un dels criteris fonamentals per a la seva correcta classificació. La textura de les colònies pot ser d'aspecte vellutat (els conidiòfors neixen directament del substrat), llanós (els conidiòfors neixen de les hifes aèries), funiculós (els conidiòfors neixen del substrat i les hifes aèries es troben agrupades) i fasciculat (els conidiòfors neixen a partir d'agregats d'hifes).

En agar extracte de malta al 2% i en agar Czapek, les colònies solen ser de color verd i a vegades adopten tonalitats blanquinoses o grogues.

La morfologia microscòpica també s'usa per a la seva correcta identificació. A partir dels fiàlids s'originen els conidis que són hialins o lleugerament verdosos, de parets llises o rugoses. El conidiòfor està unit al miceli mitjançant l'àpex.

Entre aquest i els fiàlids poden aparèixer diferents cèl·lules, que es presenten agrupades partint d'un mateix punt des del que s'originen. Es poden trobar un, dos i ocasionalment tres punts de ramificació al llarg del conidiòfor. Les cèl·lules de suport dels fiàlids s'anomenen mètules i branques. Les branques poden créixer de l'àpex o de noves branques (Samson *et al.*, 2000).

A la Figura 2.9. es mostren les característiques morfològiques microscòpiques del gènere *Penicillium*.

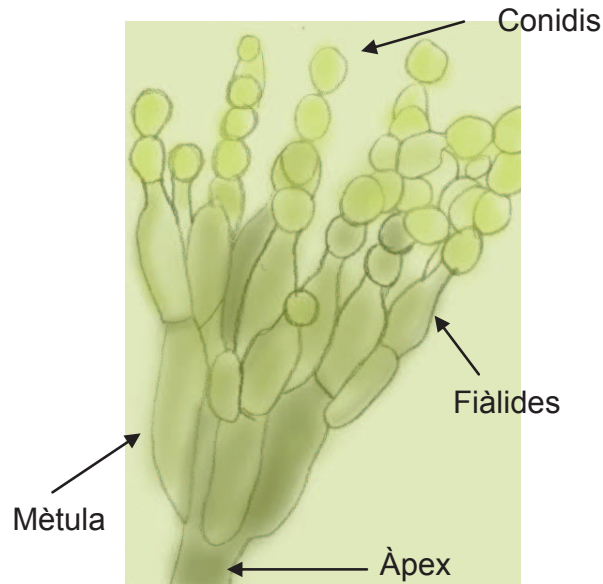


Figura 2.9. Característiques morfològiques microscòpiques del gènere *Penicillium*.

Es pot dividir el gènere *Penicillium* en subgèneres basats en el nombre i la disposició dels fiàlids, mètules i branques en l'àpex. Cada nivell de branques es compta des de la part superior de l'eix central.

La classificació de Pitt (1979) inclou quatre subgèneres: *Aspergilloides*, el conidiòfor més simple, en el qual els fiàlids creixen directament de l'àpex a les estructures de suport, *Furcatum* i *Biverticillum*, en els quals els fiàlids estan suportats per mètules, *Penicillium*, el conidiòfor més complex, els quals normalment presenten mètules i branques (Figura 2.10). Les espècies de *Biverticillum* presenten fiàlids acerosos més estrets i delicats que els que presenten la resta de subgèneres els quals tenen forma d'ampolla.

La majoria d'espècies toxigèniques més importants i que desenvolupen espores en aliments es troben dins del subgènere *Penicillium*.

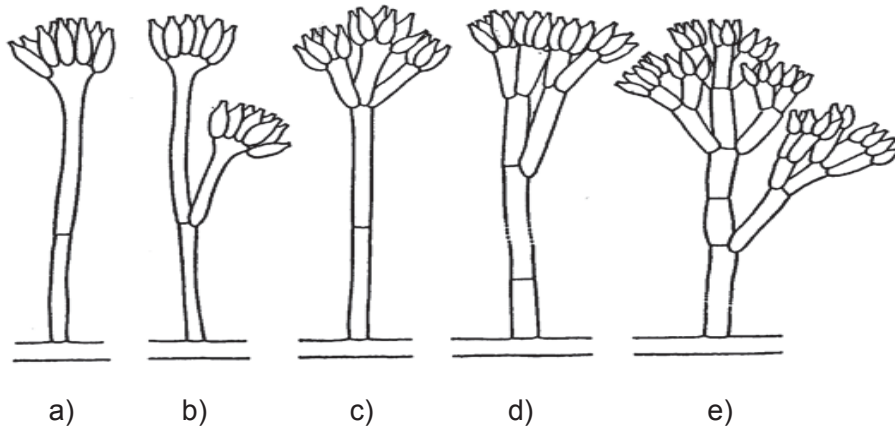


Figura 2.10. Classificació del gènere *Penicillium*. a) *Aspergilloides* (monovertil·lat); b) *Furcatum* i *Biverticillum* (biverticil·lat); c) *Penicillium* (triverticil·lat); d) *Penicillium* (quarverticil·lat); e) *Penicillium* (quarverticil·lat).

En algunes de les soques la presència o absència de gotes de l' exudat, de pigments difusibles en el medi de cultiu o la formació d'esclerocis, masses d'hifes estèrils, s'utilitza com a criteri taxonòmic d' interès. La classificació de Raper i Tom és la més clàssica, actualment però, a part de les característiques morfològiques, també es realitzen els estudis filogenètics necessaris per a la correcta identificació de les espècies.

Les espècies de *Penicillium* es poden aïllar de substrats molt diversos. Moltes d'elles tenen especial interès per ser productores d'antibiòtics, enzims, etc. Així mateix, moltes espècies també s'utilitzen a la indústria de l'alimentació per a la conversió de productes o l'obtenció de formatges.

### 2.3.2.2. Micotoxines del gènere *Penicillium*.

Identificar micotoxines resulta complex, és per això que després de revisar molts dels estudis realitzats sobre les espècies de *Penicillium* productores de micotoxines Pitt i Leistner l'any 1991 elaboren un estudi on es llisten 27 micotoxines, produïdes per 32 espècies, de les quals s'ha demostrat la seva toxicitat en animals i en humans.

El rang de micotoxines produïdes per les espècies del gènere *Penicillium* és molt extens comparat amb altres gèneres fúngics. La diversitat en estructures moleculars i toxicitat d'aquestes toxines és molt variada, es poden classificar en dos grans grups segons el lloc on afecten, fetge i ronyó i, les que es poden classificar com a neurotoxines. A la Taula 2.1 es mostra una llista de les principals toxines que afecten la salut humana produïdes per espècies del gènere *Penicillium* (Pitt i Leistner, 1991) (Cole i Cox, 1981).

Micotoxina	Espècies productores
<b>Citreoviridina</b>	<i>Penicillium citreonigrum</i> <i>Eupenicillium ochrosalmoneum</i>
<b>Citrinina</b>	<i>Penicillium citrinum</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Penicillium verrucosum</i>
<b>Àcid ciclopiazònic</b>	<i>Penicillium camemberti</i> <i>Penicillium commune</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Penicillium griseofulvum</i> <i>Penicillium viridicatum</i>
<b>Ocratoxina A</b>	<i>Penicillium verrucosum</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Penicillium vulpinum</i> <i>Penicillium griseofulvum</i> <i>Penicillium roqueforti</i>
<b>Toxina PR</b>	<i>Penicillium roqueforti</i>
<b>Roquefortina C</b>	<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Penicillium crustosum</i>
<b>Àcid secalònic C</b>	<i>Penicillium oxalicum</i>

Taula 2.1. Llista de toxines produïdes per espècies del gènere *Penicillium*.

### **2.3.3. Relació fong-micotoxina.**

Els fongs estan formats per una o més cèl·lules eucariotes, no tenen teixits diferencials i són heteròtrofs, és a dir, no tenen clorofil·la i no fan la fotosíntesi. S'alimenten dels residus animals o vegetals que hi ha al seu entorn i secreten enzims per digerir-los; és aquesta darrera característica la que els diferencia dels animals, ja que ells digereixen els aliments a l'interior del cos.

També tenen un gran interès econòmic: n'hi ha que es fan servir en l'obtenció de fàrmacs, uns altres en la producció d'aliments (formatge, cervesa, etc) i n'hi ha de comestibles (bolets); alguns però, poden ser molt tòxics i perjudicials pels éssers humans.

Quan una espora d'una floridura es comença a desenvolupar origina una hifa o filament format per una filera de cèl·lules. Les hifes creixen ràpidament i formen el que s'anomena miceli.

Algunes hifes que creixen verticalment formen unes estructures terminals anomenades esporangis que és on es formen les espores, les unitats reproductives del fong. Segons els tipus d'hifes i d'esporangis classifiquem els fongs en ficomicets (600 espècies com les floridures del pa), basidiomicets (unes 25.000 espècies i inclouen molts dels bolets) i ascomicets (unes 30.000 espècies com els llevats, les tòfones o els *Penicillium* que serveixen per obtenir penicil·lina i també per fer formatges com el *Roquefort* o el *Camembert*).

Un cop han acabat el creixement, els fongs, ja tenen les necessitats bàsiques cobertes, és llavors quan comencen a produir metabòlits secundaris.

Els productes residuals del metabolisme secundari que s'acumulen al vacúol són molt diversos i per exemple s'hi troben pigments com els antocians, tanins de gust amargant, cristalls d'oxalat, les aflatoxines i les ocratoxines. Aquests metabòlits no tenen cap funció primària per a la cèl·lula, és a dir, no serveixen d'aliment ni de font d'energia però, en molts casos, han adquirit funcions que són anomenades funcions secundàries. S'ha demostrat una relació entre l'eficàcia reproductiva i el contingut en pigments.

Els residus metabòlics tòxics pel citoplasma són transportats unidireccionalment a través del tonoplast i queden atrapats a l'interior del vacúol i d'aquesta manera deixen de ser tòxics pel fong. En aquest sentit, el vacúol fa una funció que en els animals porta a terme el sistema excretor.

La presència i el perill associat a una micotoxina pot ser determinada després de l'extracció i identificació de la mateixa (Figura 2.11) ja que:

La presència del fong no assegura que existeixi una micotoxina

La micotoxina continua en el producte encara que el fong hagi desaparegut.

Un fong pot produir més d'una micotoxina

Una determinada micotoxina pot ser formada per més d'una espècie de fong.

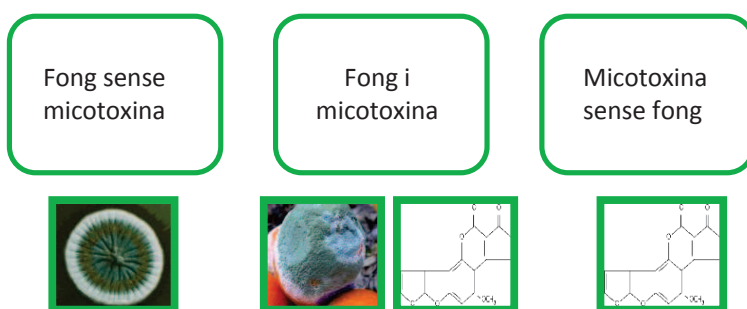


Figura 2.11. Relació que es pot establir entre un fong micotogigènica i la micotoxina produïda



### 2.3.3.1. Factors que afecten el creixement fúngic i la producció de toxines.

A continuació, s'agrupen els factors que poden afectar al desenvolupament de fongs i a la producció de les toxines en tres grans blocs: factors físics, factors químics i factors biològics (Pitt i Hocking, 1997) (Gimeno i Martins, 2003).

#### 2.3.3.1.1. Factors físics.

##### a) Temps

El temps d'incubació de la soca fúngica és un paràmetre a considerar molt important ja que d'ell dependrà la producció de toxines.

En la relació entre el creixement del fong i la producció de toxines s'identifiquen dues fases generals. La primera s'anomena tropofase (Bu'Lock, 1965), es caracteritza per la producció de biomassa per part del microorganisme amb una utilització màxima dels nutrients, sense que hi hagi elaboració de metabòlits secundaris.

Quan el creixement davalla o bé desapareix totalment, es comencen a elaborar metabòlits secundaris, aquesta fase s'anomena idiofase (Figura 2.12.).

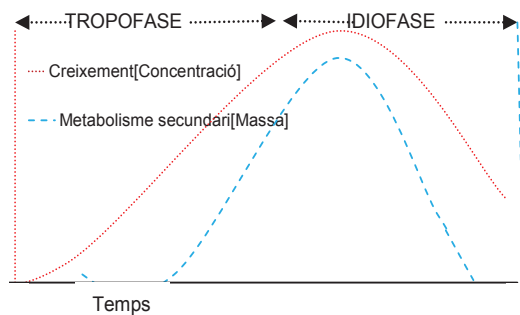


Figura 2.12. Etapes del creixement fúngic i metabolisme secundari.

**b) Activitat d'aigua ( $a_w$ ).**

La quantitat d'aigua existent tant a l'ambient com al substrat i la forma de presentació de la mateixa, ja sigui de forma lliure o combinada, és un dels factors a considerar pel desenvolupament dels fongs i per a la producció de toxines.

L'aigua lliure existeix a dins i als voltants dels teixits vegetals o de les cèl·lules i pot ésser eliminada sense interferir en els processos vitals.

Per la germinació dels conidis dels fongs, és necessari que l'aigua estigui en forma lliure. La forma combinada està present en teixits vegetals i animals, formant part de les cèl·lules que la formen.

És per a la mesura de l'aigua disponible que s'utilitza el terme activitat de l'aigua ( $a_w$ ).

L' $a_w$  és la relació entre la tensió de vapor de l'aigua en el substrat ( $P$ ) i la de l'aigua pura ( $P_0$ ), a la mateixa temperatura ( $a_w = P/P_0$ ). Si la humitat de l'aliment està en equilibri amb la humitat relativa d'equilibri (HRE) de l'atmosfera que el rodeja, l'aigua disponible a l'aliment és numèricament equivalent a aquesta ( $a_w = \text{HRE}/100$ ). Cal tenir present que la HRE es refereix a l'atmosfera en equilibri amb el producte i l' $a_w$  fa referència al propi producte. L' $a_w$  permet relacionar l'aigua lliure dels aliments i la capacitat dels microorganismes per proliferar en el substrat.

La major part dels fongs toxigènics es desenvolupen a valors d' $a_w$  de 0,70 a 0,85. S'ha estudiat molt la producció de toxines i la influència de l' $a_w$ . Es pot dir que la producció de les toxines és nul·la o molt baixa a  $a_w$  inferiors a 0,83 (Magan i Lacey, 1984).

**c) Temperatura.**

La temperatura d'incubació de soques fúngiques determina la població fúngica present i la possible formació de micotoxines. La temperatura es considerada un dels factors més condicionants en la producció de toxines (Magan i Lacey, 1984). La temperatura òptima per al desenvolupament de la gran majoria de fongs és entre 25 i 30°C i el límit màxim d'entre 45- 50°C. La majoria de fongs no creixen per sota de 5°C ni per sobre de 55° encara que hi ha algunes excepcions com *A. flavus*, *A. candidus* que poden créixer fins als 55°C i d'altres com *P. expansum* que pot créixer a 0°C.

Les temperatures baixes (8-10°C) indueixen una menor producció de les aflatoxines.

La temperatura òptima de producció de l'aflatoxina B<sub>1</sub> és entre 24 i 28°C mentre que l'òptim de formació per l'aflatoxina G<sub>1</sub> és de 30°C. Per afavorir la producció de toxines és millor mantenir la temperatura constant a 25°C que no pas que la temperatura fluctuï donant una mitja de 25°C.

De forma generalitzada s'associa la producció d'OTA en climes freds a *P. verrucosum* ja que és capaç de créixer a partir de 0°C i produir toxines a partir de 4°C (Sweeney i Dobson, 1998) essent la temperatura òptima de producció de 20 a 25°C (Doyle *et al*, 2000). En països més càlids o temperats la producció d'OTA està majoritàriament atribuïda amb les espècies productores del gènere *Aspergillus*. *A. ochraceus* produeix OTA a partir de 12°C amb un màxim de producció als 25°C (Northolt *et al.*, 1998) (Horie, 1995).

### 2.3.3.1.2. Factors químics.

#### a) pH

El pH influeix en el creixement de fongs i la producció de toxines tot i que el seu efecte sembla no ser tant significatiu com la temperatura i el substrat (Magan i Lacey, 1984).

Els fongs toleren un gran interval de pH en el substrat de creixement de 2.5 a 7.5.

A trets generals, suporten millor el medi àcid que el medi alcalí (Petterson i Damoglou, 1986).

#### b) Composició del substrat.

La composició del substrat està molt relacionada amb el creixement fúngic i producció de micotoxines (Davis *et al.*; 1969). La presència o absència de micronutrients, sobretot en el cas de l'OTA (Bullerman, 1985), influeix més significativament a la biosíntesis de toxina que al creixement fúngic. Cada família de toxines és produïda òptimament en un substrat diferent per exemple, soja i cacauets, en el cas de les OTA d'*A. ochraceus* i blat o blat de moro en el cas de *P. verrucosum*.

D'altra banda, els nutrients minerals estan relacionats amb la composició del substrat i encara que Fe, Zn i Cu són elements més importants per a un desenvolupament fúngic, tant aquests com altres poden ser necessaris per a la producció de micotoxines (Bullerman, 1985b). L'addició de Cu, Cd, Fe, Mo ( 5 a 10 µg/g) i de Zn ( 50 a 250µg/g) , incrementen la producció d'aflatoxines. Quan es disminueixen les concentracions de Zn i Cu la producció d'OTA és quasi nul·la (Steele *et al.*,1973).

En resum, el substrat és un factor que té molta influència sobre la quantitat de toxina produïda.

**c) Atmosfera.**

La majoria dels fongs són aerobis i per tant necessiten oxigen per al desenvolupament de les seves reaccions metabòliques. Una carència d'oxigen condiciona el creixement de les floridures i la no presència d'aquest els pot causar la mort. La reducció de la concentració d'O<sub>2</sub> del 5 a l'1% redueix la producció d'aflatoxines (Davis i Diener, 1968). L'anhídrid carbònic pot inhibir la formació d'algunes micotoxines.

La producció d'aflatoxines disminueix a mesura que augmenta el contingut de CO<sub>2</sub> (Davis i Diener, 1968).

**2.3.3.1.2. Factors biològics.**

**a) Presència d'invertebrats.**

La presència d'insectes és un agent disseminador de la microbiota i per tant, contribueix al creixement i multiplicació dels fongs.

**b) Soques específiques.**

En una mateixa espècie fúngica, les soques no es comporten de la mateixa manera. Aquest fet provoca que dues soques incubades a les mateixes condicions de temperatura, temps, pH i substrat poden no produir la mateixa quantitat de toxina, o fins i tot que una d'elles sigui incapaç de produir-la.

## 2.4. Soques productores de toxines *Aspergillus parasiticus* i *Aspergillus ochraceus*.

L'*Aspergillus parasiticus* és un fong descrit com a productor de les aflatoxines B<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i l'*Aspergillus ochraceus* és descrit com a productor de l'ocratoxina A.

El metabolisme primari d'aquests fongs és similar al de la majoria d'organismes eucariotes. En ambdós fongs els metabòlits secundaris són formats a partir d'intermediaris del metabolisme primari i sota condicions subòptimes i d'estrès (Cole *et al.*, 1985).

Durant la biosíntesis d'aquests metabòlits, la quantitat produïda depèn no només de paràmetres nutritius i ambientals, sinó també de la història prèvia del desenvolupament del fong. La formació de micotoxines reflecteix que la floridura ha aconseguit cert grau de diferenciació bioquímica, fisiològica i de vegades morfològica. Com més complexa és la ruta biosintètica d'aquests metabòlits secundaris, més restringit és el nombre d'espècies de fongs productors d'aquestes micotoxines. (Keller i Turner, 2005).

### 2.4.1. Síntesis de les aflatoxines i l'ocratoxina A.

La biosíntesis de les aflatoxines és un procés complex que implica reaccions multienzimàtiques. Es dona per la via metabòlica dels policètids, la més important en el metabolisme secundari dels fongs. Aquest procés involucra la condensació de l'acetil CoA amb el malonil CoA en un procés cíclic similar en alguns aspectes al de la biosíntesis d'àcids grassos de cadena llarga (Ellis, 1991). El punt clau d'aquesta síntesi, tal i com es mostra a la Figura 2.13, (Kelkar *et al.*, 1997) recau en la reacció de formació de l'intermedi (VER A), ja que és a partir d'aquest punt on s'obté l'aflatoxina B<sub>1</sub> i a partir d'aquesta la G<sub>1</sub> o bé l'aflatoxina B<sub>2</sub> i a partir d'aquesta la G<sub>2</sub>.

S'han realitzat molts estudis sobre la producció d'aflatoxines. A les conclusions a les quals s'ha arribat són que el medi àcid, la presència de Zn, la de nitrats i el no estrès del fong originen un increment de la seva producció (JiujiangYu i Kenneth, 2011).

La ruta biosintètica de l'OTA proposada per Huff i Hamilton el 1979, postula tres etapes diferents. La primera, correspon a la síntesis d'un residu poliquètid a partir d'acetilCoA i malonat. En un primer pas, s'obté melleina com a intermedi. A continuació, la melleina és metilada i oxidada, donant lloc a ocratoxina  $\beta$ , i un àtom de clor es incorporat directament per donar lloc a ocratoxina A (Wei *et al.*, 1971).

Durant la segona etapa es sintetitza l'altre precursor, la fenilalanina, a partir d'àcid shikimic, que s'uneix a la ocratoxina  $\alpha$  (Ferreira i Pitout, 1969). Durant la tercera etapa, un enzim sintetasa genera ocratoxina C, i una esterasa finalment forma l'OTA (Figura 2.14).

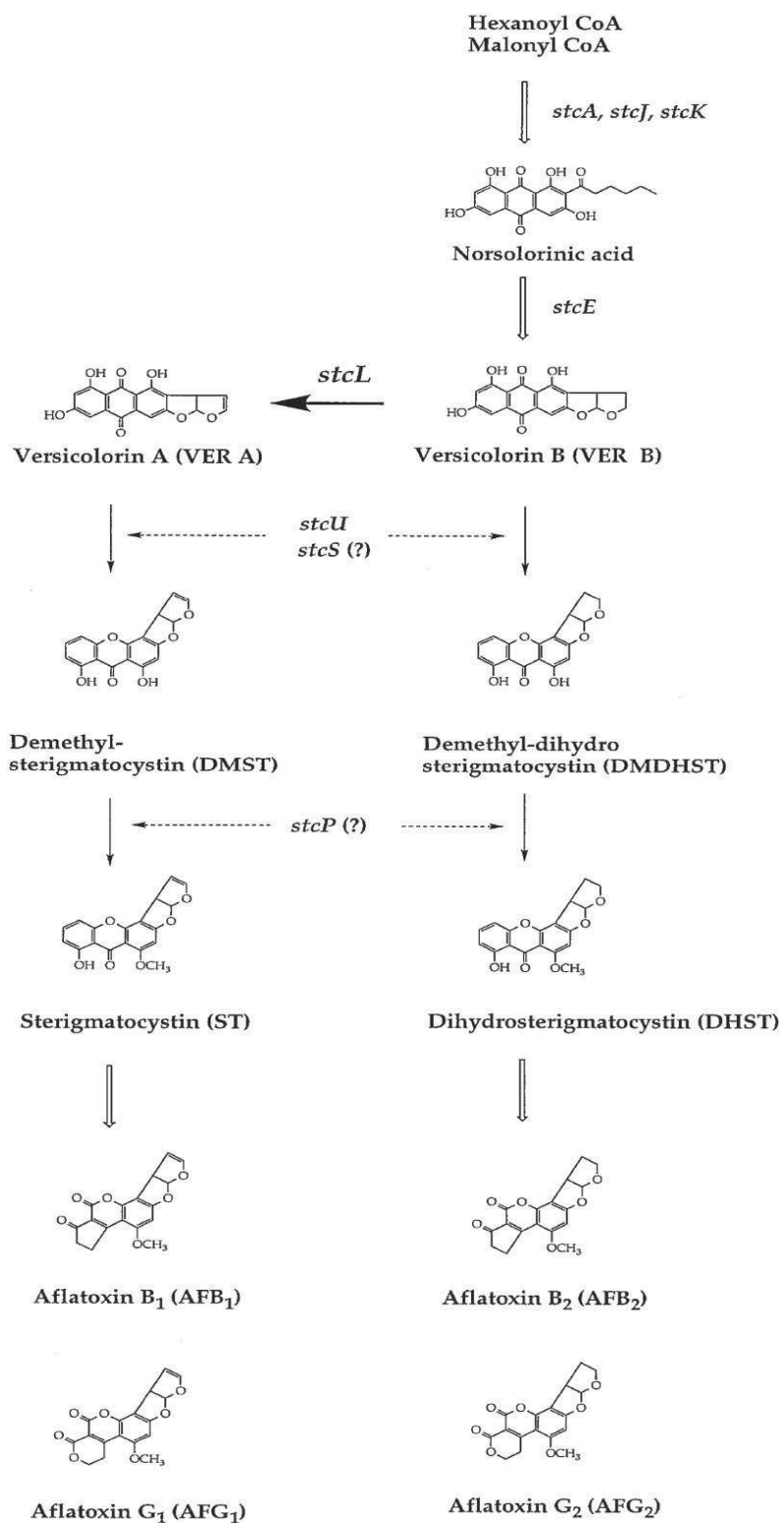


Figura 2.13. Representació esquemàtica de la ruta biosintètica de les aflatoxines (Kelkar *et al.*, 1997).



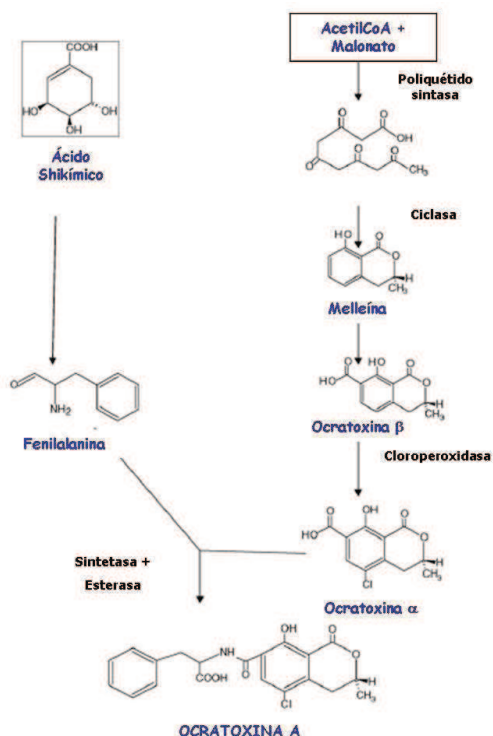


Figura 2.14. Representació esquemàtica de la ruta de biosíntesi de OTA (Huff i Hamilton, 1979).

## 2.5. Freqüència i toxicitat.

Les aflatoxines i les ocratoxines es troben com a contaminants naturals en productes alimentaris d'origen vegetal. També es poden detectar en productes carnis obtinguts a partir de bestiar que ha estat alimentat amb aliments contaminats. Hi ha doncs la necessitat de realitzar estudis metabòlics i de transferència d'aflatoxines a carn i ous provinents d'aus de corral, així com la llet de remugants ja que les toxines són solubles en greixos i per tant sembla fàcil que aquestes s'introdueixin a la cadena alimentària humana ([www.gencat.cat/salut/acsa](http://www.gencat.cat/salut/acsa)).

En quan a toxicitat, l'aflatoxina B<sub>1</sub> està considerada com un dels components cancerígens més potents de la naturalesa. L'Agència Internacional per a la Recerca en el Càncer (IARC) la va classificar en el Grup 1 (IARC, 1987), considerant-les cancerígenes per a l'home.

Posteriorment, l'OTA s'ha classificat dins el grup 2B (IARC, 1993), com a agent possiblement carcinogen per a l'home en base als estudis realitzats en animals d'experimentació. Encara no es disposa de proves suficients per assegurar que és cancerígena pels éssers humans.

Altres malalties que poden produir les aflatoxines són alteracions hepàtiques i les de les ocratoxines són afectacions de l'aparell renal.

## **2.6. Legislació sobre micotoxines.**

A dia d'avui no hi ha una normativa universal clara sobre els nivells permessos de micotoxines en matrius alimentàries. Hi ha una gran heterogeneïtat respecte al nombre de toxines regulades, els països que les controlen i els nivells permessos en els diferents països. Cal esperar que aquesta heterogeneïtat legislativa en breu s'homogeneïtzi en l'àmbit comunitari europeu, fet que probablement comportarà un augment de toxines regulades en el nostre país. Els productes exportats de països tropicals o subtropicals amb climes humits i càlids no tenen un límit màxim de toxines i si els tenen, són clarament superiors als dels països amb climes freds. A l'Estat espanyol, el Real Decreto 475/88 del BOE 20/05/88 és el document base que regula el contingut màxim d'aflatoxines en aliments destinats al consum humà. Aquesta normativa ha anat incorporant canvis de legislació provocats per altres lleis que han modificat algun dels límits màxims de contingut en aflatoxines. En són un exemple el Reglament (UE) 165/2010 que modifica el contingut màxim d'aflatoxines totals en avellanes i nous de Brasil, passant de 4 µg/Kg a 10µg/Kg o el Reglament (UE) 1058/2012 que modifica el contingut màxim d'aflatoxines en figues passant, igual que en cas anterior, de 4 µg/Kg a 10µg/Kg.

La presència de micotoxines a nivells superiors als tolerables representa una amenaça per a la innocuïtat dels aliments i un risc important per a la salut humana.

Les aflatoxines són presents en productes alimentaris com ara les nous, les figues i altres fruits secs, les espècies i els greixos vegetals crus.

Els nivells màxims establerts d'aflatoxina B1 i aflatoxines totals segons la legislació actual són els que es troben detallats a la Taula 2.2.

Productes alimentaris ( 1 )	Continguts màxims (µg/kg)	Continguts màxims (µg/kg)
Aflatoxines	B 1	Suma de B 1 , B 2 G1,G2
Cacauets i altres llavors oleaginoses amb tractament posterior abans del consum.	8	15
Cacauets i altres llavors oleaginoses.	2	4
Ametlles, festucs i pinyols d'albercoc amb tractament abans del consum.	12	15
Ametlles, festucs i pinyols d'albercoc.	8	10
Avellanes i nous del Brasil amb tractament abans del consum.	8	15
Avellanes i nous del Brasil.	5	10
Fruïtes amb tractament posterior abans del consum.	5	10
Figues seques	4	10
Tots els cereals i tots els productes a base de cereals transformats.	2	4
Blat i arròs amb tractament posterior abans del consum	5	10
Diferents espècies	5	10
Aliments dietètics destinats a usos mèdics especials	0,1	—

Taula 2.2. Nivells màxims permesos d' aflatoxines en diferents matrius alimentàries. Font: Real Decreto 475/88 del BOE 20/05/88

### **2.6.1. Altres matrius on es poden trobar les aflatoxines.**

A continuació s'exposen altres matrius on s'han detectat micotoxines, per exemple en begudes o productes que han estat elaborats a partir de productes contaminats, ja que aquestes micotoxines són compostos termoresistents i no es destrueixen en la majoria de les etapes de processat d'aliments i poden fins i tot trobar-se en etapes posteriors. Les matrius alimentàries més habituals on s'han detectat aflatoxines i ocratoxines són: cereals i subproductes de cereals, soja, te, cafè, cacau i derivats, suc de fruita, most, fruits, fruits secs, espècies, cervesa, vi, productes làctics, etc.

Com s'ha dit a l'apartat 2.6, també s'han detectat toxines en productes carnis, o bé en els seus derivats, procedents d'animals que han estat alimentats amb menjar contaminat.

L'Agència Nacional de Seguretat Sanitària de l'Alimentació del Medi Ambient i del Treball Francesa ([www.anses.fr](http://www.anses.fr)) va fer pública una avaluació de risc sobre micotoxines en la cadena alimentària tant animal com humana.

Aquesta avaluació recull recomanacions per als principals grups de micotoxines com és el cas de les aflatoxines, on subratlla la necessitat de la realització d'estudis metabòlics i de transferència d'aquestes micotoxines a carn i ous provinents d'aus de corral, així com la llet de petits rumiants exposats a quantitats mínimes d'aflatoxines.

També posa èmfasi, de manera general, en la necessitat d'estudis prolongats de concentració de micotoxines en cultius.

La quantitat de micotoxines presents en aliments acostuma a ser baixa, al voltant de poques desenes de µg/kg; és per aquest fet que no és probable que causin intoxicacions agudes en els éssers humans. Però la presència continuada de micotoxines a baixes concentracions en els aliments representa un risc potencial per a la salut humana, de manera que cal vigilar i controlar els nivells en què aquestes es troben.

## **2.7. Detecció de fongs micotoxigènics.**

No totes les soques fúngiques d'una mateixa espècie tenen la capacitat de produir toxines, és per això que s'avalua aquesta capacitat aïllant el fong, i comprovant si es capaç de produir i acumular toxina.

Com s'ha comentat, quan una espora té unes condicions ambientals adequades de llum i humitat, arriba a germinar. Llavors produeix la hifa, que creix sobre el substrat, ramificant-se. Hi ha una gran diversitat de substrats que permeten el desenvolupament fúngic (sòl, herba, etc). L'important és que aquest proporcioni al fong els nutrients necessaris per créixer. Actualment existeixen diferents metodiques per a la detecció de fongs micotoxigènics. El mètode proposat per la Food and Drug Administration usa arròs com a substrat.

## **2.8. Mètode de la Food and Drug Administration per a la detecció de micotoxines.**

El mètode escollit per la Food and Drug Administration (FDA, 1998) per a la determinació de la producció de toxines per part de fongs, desenvolupa la soca fúngica en estudi utilitzant arròs com a substrat i posteriorment realitza una extracció amb cloroform per a la detecció de la toxina.

En l'etapa de detecció de les toxines es recomana aplicar un dels mètodes descrits per (Samson *et al.* 1992), (Stack, 1996) o (AOAC, 2003), que utilitzen diferents tècniques cromatogràfiques.

### **2.8.1. Control de micotoxines.**

Al llarg del temps, s'ha desenvolupat un ampli rang de mètodes analítics sensibles per a la determinació de micotoxines en una gran varietat de matrius alimentàries, cap però per una matriu tant diferent com és la de compost (Navajas *et al.*, 2010). En l'època del descobriment de les aflatoxines, la separació i detecció d'aquestes es realitzava per cromatografia de capa fina (TLC) utilitzant una gran varietat de solvents d'elució i observant les plaques sota la llum ultraviolada (UV). Posteriorment, amb el desenvolupament de la cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC), la utilització de la TLC ha quedat desplaçada a un segon terme. L'HPLC ofereix més precisió, un poder de resolució més elevat, és fàcil d'automatitzar i s'obtenen límits de detecció més baixos.

En contraposició, la TLC és simple, robusta i és relativament barata d'implementar en un laboratori d'anàlisi.

Així el mètode analític més emprat en la determinació d'aquest tipus de micotoxines és la cromatografia líquida de fase inversa amb detector de fluorescència, ja que s'aprofiten les propietats fluorescents d'aquestes. En el cas de voler detectar nivells encara més baixos de toxines, es realitzen derivatitzacions pre o post columna per tal d'augmentar la fluorescència dels analits i poder tenir millors límits de detecció. Però, avui en dia, és habitual treballar amb un equip d'HPLC utilitzant com a detector un espectròmetre de masses que són més sensibles, selectius i eviten els problemes causats per la derivatització.

D'altra banda, en aquells casos que interessa detectar presència o absència de toxina en una mostra i a un nivell de concentració determinat o en un marge de concentracions, s'usen generalment mètodes d'anàlisi immunosorbent amb enzim lligat (ELISA).

El principal avantatge d'aquests mètodes és que la instrumentació que utilitzen és simple i de baix cost, o fins i tot poden no requerir-ne, però en el cas de detectar la presència d'una determinada micotoxina, s'han de confirmar posteriorment per tècniques analítiques convencionals.

En els següents apartats es fa un breu resum de cada una de les etapes que intervenen en una anàlisi de micotoxines.

#### **2.8.1.1. Extracció en fase líquida.**

El solvent a utilitzar dependrà de la naturalesa de la matriu, de l'analit i dels post tractaments que es realitzaran per analitzar la mostra.

Els solvents d'extracció més emprats en l'anàlisi d'aflatoxines en matrius alimentàries són: cloroform, metanol, acetona, acetonitril, benzè i hexà. El nostre grup ha utilitzat una barreja de metanol:aigua per extreure les aflatoxines dels anacards (Alfaro *et al.*, 2013).

La matriu que s'analitza en aquest treball és el compost i el solvent d'extracció que s'ha trobat descrit és una barreja de metanol:aigua (Navajas *et al.*, 2010).

En cas d'usar tècniques d'immunoassaig a l'etapa de purificació, s'empren mescles de metanol amb aigua o acetonitril com a solvent d'extracció. Cole i Dorner (1994) han descrit que la utilització de la mescla acetonitril:aigua és menys eficient que la mescla metanol:aigua usada en diferents relacions de solvent d'extracció/mostra en l'anàlisi d'aflatoxines en cacauets.

Els principals problemes relacionats amb l'extracció d'aflatoxines són la formació d'emulsions, extraccions incompletes en algunes matrius i la coextracció de compostos que interfereixen a la quantificació. En el cas d'extreure les toxines del fong, es podrien extreure altres productes produïts com ara pigments, etc.

Optimitzar l'etapa d'extracció és important pel medi ambient ja que l'ús de dissolvents orgànics, sobretot si aquests són clorats, és perjudicial pel medi ambient i poden encarir el preu de les anàlisis.

### 2.8.1.2. Extracció en fase sòlida.

Es considera l'extracció en fase sòlida (SPE) com un mètode equivalent a un procés cromatogràfic, en el que l'adsorbent és la fase estacionària. És especialment indicat per mostres líquides, ja que realitza l'etapa d'extracció i concentració simultàniament.

La SPE comença amb un condicionat del cartutx prèviament activat amb un solvent i/o aigua. Posteriorment, s'aplica la mostra i els analits queden retinguts a l'adsorbent d'extracció. Després d'una etapa de rentat, per tal d'eliminar els compostos interferents, la toxina s'elueix del cartutx amb un solvent orgànic i si és necessari es concentra per evaporació mitjançant una corrent de  $N_2$ . A la Figura 2.15. es mostra un esquema del principi de funcionament de la SPE.

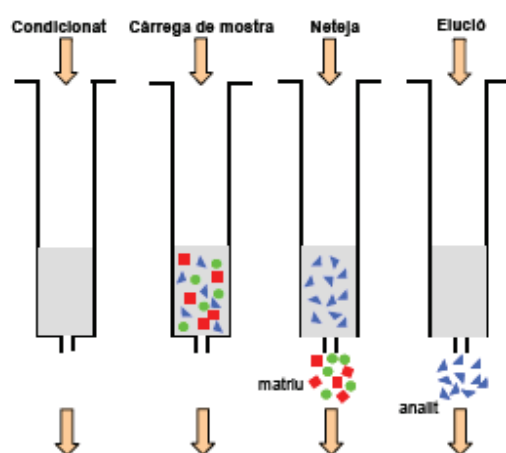


Figura 2.15. Esquema de funcionament dels cartutx. (Font: [www.services.leatherheadfood.com](http://www.services.leatherheadfood.com))

Des de l'any 2000, es comercialitza un reblert d'extracció en fase sòlida anomenat OASIS (Waters) per solucionar les limitacions de l'extracció en fase sòlida tradicional i racionalitzar el procés de preparació de mostra.

Aquests, no van ser aplicats en la determinació de micotoxines o productes relacionats fins la tesi doctorals de Ventura (2005) .



Es comercialitzen diferents tipus de reblert OASIS (HLB, MAX i MCX) per poder optimitzar l'extracció en funció de l'analit a analitzar. Aquests reblerts estan disponibles en diverses configuracions: cartutxos, plats i columnes. Es disposa de dos mides de partícula del reblert, de 30 i 60 µm, que es selecciona en base a la terbolesa i viscositat de la mostra. Per mostres viscoses, s'aconsella utilitzar un reblert amb mida de partícula més gran.

En el cas de **OASIS®HLB**, són cartutxos de SPE que el seu reblert és polimèric en fase inversa. El copolímer de divinilbenzè-N-vinilpirrolidona (Figura 2.16) presenta propietats hidrofíliques i lipofíliques. HLB és un acrònim de balanç hidrofílic lipofílic (*Hydrophilic Lipophilic Balance*) el qual descriu les dues característiques més importants del reblert:

- manté la humitat.
- reté un ampli marge de compostos tant polars com apolars.

Segons la casa comercial, els cartutxos d'extracció en fase sòlida OASIS® HLB permeten aconseguir recuperacions reproduïbles i elevades per un ampli marge d'analits utilitzant protocols d'extracció ràpids i senzills. A més, l'adsorbent es pot assecar durant l'extracció fet que facilita el maneig i l'obtenció de bons resultats.

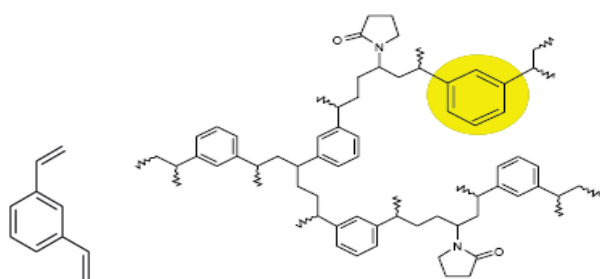


Figura 2.16. Reblert polimèric del cartux d'OASIS. (Font: [www.scielo.org.ar](http://www.scielo.org.ar))

## 2.9. Tècniques cromatogràfiques.

### 2.9.1. Cromatografia de capa fina (TLC)

Actualment, la TLC s'usa en alguns mètodes oficials i per a la determinació de micotoxines a mode de *screening* (Machinski *et al.*, 2001), és a dir, absència o presència ja que:

- Minimitza les etapes de preparació de mostra.
- Permet l'anàlisi en paral·lel d'un gran nombre de mostres.
- Possibilita la recuperació de l'anàlisi per anàlisis posteriors.
- Es poden portar a terme simultàniament diversos protocols de *screening*.

S'han desenvolupat un gran nombre de mètodes tant per a la determinació d'aflatoxines com ocratoxines per TLC en fase normal o bé en fase inversa (Frohlich *et al.*, 1988).

Les cromatoplaques de sílica són les més usades amb una àmplia varietat de mescles de solvents. Els solvents d'elució més emprats en TLC de fase normal en l'anàlisi d'aflatoxines s'indiquen a continuació (Lin *et al.*, 1998) (AOAC, 2003).

- Benzè:metanol:àcid acètic (90:5:5)
- Èter dietílic:metanol:aigua (96:3:1)
- Cloroform:xilè:acetona (6:3:1)
- Diclorometà:cloroform:alcohol amílic:àcid fòrmic (80:15:4:1)
- Cloroform:cloroform:alcohol amílic:àcid fòrmic (80:15:4:1)
- Cloroform:acetona:H<sub>2</sub>O (88:12:1.5)
- Cloroform:acetona:isopropanol:aigua (88:12:1.5:1)
- Xilè:acetat d'etil:àcid acètic (6:3:1)
- Cloroform:isopropanol (99:1)
- Cloroform:acetona (90:10)
- Toluè:acetat d'etil:èter dietílic:àcid fòrmic (25:35:40:5)
- Toluè:acetat d'etil:àcid fòrmic (48:40:12)

Per a l'OTA la mescla de solvents més emprats en TLC de fase normal es mostren a la següent llista (Lin *et al.*, 1998) (AOAC, 2003).

- Toluè:acetat d'etil:àcid fòrmic (90%) (5:4:1)
- Èter dietílic:metanol (49:1)
- Hexà:acetat d'etil:àcid acètic (18:3:1)
- Metanol:aigua (7:3)
- Èter dietílic:hexà:àcid fòrmic (70:30:1)
- Cloroform:metanol:aigua:amoníac (70:30:2:2)
- Benzè:metanol:àcid fòrmic (18:1:1)
- Hexà:acetona:àcid fòrmic (18:2:1)

L'aplicació de la cromatografia de capa fina d'elevada resolució també s'ha descrit per a la determinació d'aflatoxines, ja que aquestes tenen factors de retenció (RF) molt propers i la seva separació és crítica (Tabata *et al.*, 1993), i OTA (Dawlatana *et al.* 1996).

En una placa de HPTLC es redueix l'espessor de fase estacionaria (~200 µm) i la mida de partícula (~5 µm), respecte a la TLC, així s'aconsegueix millorar les separacions amb menor temps. El principal desavantatge és la menor capacitat de càrrega de la placa i com a conseqüència pitjors límits de detecció.

Les aflatoxines i ocratoxines presenten una intensa fluorescència natural de manera que es poden observar sota la llum UV a 365 nm sense necessitat d'aplicar a les plaques cromatogràfiques etapes posteriors de revelat. Al sotmetre les aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub> sota llum UV de 365 nm es distingeixen 2 taques de color blau i dues de color verd corresponent a les aflatoxines B i G, respectivament. La taca d'OTA s'observa de color verd al ser irradiada amb llum UV a 365 nm.

Per a processos de quantificació en TLC és convenient l'ús d'un fotodensímetre com a instrument de mesura realitzant una recta de calibratge amb patrons.

### 2.9.2. Cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC).

A continuació es realitza un repàs de com s'han detectat les toxines del nostre interès a través de la cromatografia mitjançant la tècnica d'HPLC.

La separació d'aflatoxines per HPLC en fase normal es va veure desplaçada per la utilització d'una fase inversa. En molts casos, i per detectar concentracions baixes de toxina, es realitzava una pre o post derivatització per tal d'augmentar la fluorescència de les aflatoxines B<sub>1</sub> i G<sub>1</sub> (Stroka *et al.*, 2000a) (Shepherd i Gilbert, 1984) (Tarter *et al.*, 1984) (Kok *et al.*, 1986) (Jansen *et al.*, 1987). A continuació es descriuen breument en què consisteixen aquests dos processos.

Derivatització precolumna: Les aflatoxines B<sub>1</sub> i G<sub>1</sub> poden substituir un grup H per un OH, originant les respectives aflatoxines B<sub>2a</sub> i G<sub>2a</sub>. Per fer-ho s'empra àcid trifluoroacètic, d'aquesta manera s'augmenta la fluorescència.

Derivatització postcolumna: La transformació química post columna de les aflatoxines B<sub>1</sub> i G<sub>1</sub> es realitza amb iode o brom.

El sistema de derivatització post columna es basa en la utilització d'una segona bomba, una peça d'acoblament en forma de T, tub capil·lar i bany d'escalfament o reactor post columna per a la reacció.

Es connecten la sortida de la columna cromatogràfica i la sortida de la segona bomba que impulsa el reactiu que derivatitza a la peça d'acoblament en forma de T.

L'extrem que queda lliure es connecta a l'entrada del detector. El tub capil·lar s'ha de mantenir a la temperatura de reacció de 70°C, utilitzant un forn o un bany d'aigua.

S'han descrit diferents mètodes per a la derivatització postcolumna. Shepherd i Gilbert (1984) i Thiel *et al.* (1986) han descrit la introducció de solucions aquoses de iode i brom a l'eluent de la columna cromatogràfica present a la fase mòbil. El brom generat reacciona amb les aflatoxines B<sub>1</sub> i G<sub>1</sub> per donar els derivats fluorescents.

El mètode proposat per a l'AOAC per a la determinació d'aflatoxina B<sub>1</sub> en aliments per a nadons usa derivatització postcolumna amb generació electroquímica de brom (AOAC, 2003).

La derivatització post columna amb iode o brom presenta bàsicament una desavantatge respecte a la derivatització precolumna ja que requereix l'ús de dues bombes cromatogràfiques.

En el cas de l'OTA, la majoria dels treballs publicats usen l'HPLC de fase inversa acoblada a un detector de fluorescència.

### 2.9.3. Cromatografia líquida d'alt rendiment (UHPLC).

La cromatografia líquida d'alt rendiment és un tipus de cromatografia desenvolupada recentment. El fonament d'aquesta tecnologia es basa en utilitzar columnes cromatogràfiques amb mida de partícula més petita que les utilitzades en HPLC.

L'equació empírica més completa que permet avaluar l'eficàcia d'una columna cromatogràfica es l'equació de van Deemter que descriu la relació entre la velocitat lineal i l'eficàcia de la columna cromatogràfica.

A la Figura 2.17. es mostra el perfil que presenta l'equació de van Deemter a l'utilitzar columnes cromatogràfiques de diferents mides de partícula. S'observa que l'ús de columnes cromatogràfiques amb mides de partícules inferiors a 2.5  $\mu\text{m}$ , no només proporcionen un augment de l'eficàcia sinó que també s'obté una regió molt més ampla en la que és manté la mateixa eficàcia.

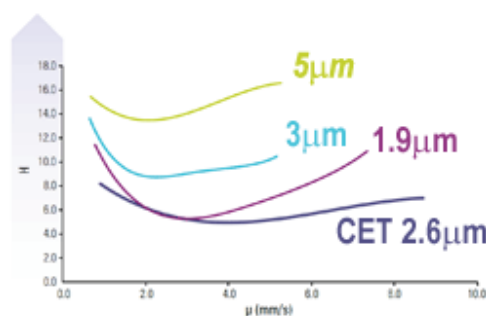


Figura 2.17. Perfil de l'eficàcia segons l'equació de van Deemter a l'utilitzar columnes cromatogràfiques de diferents mides de partícula. (Font: [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com))

La utilització de columnes cromatogràfiques amb mides de partícules menors requereix treballar a rangs de pressió superiors als que pot treballar un equip HPLC. Per exemple, per una columna de 10 cm de llarg empaquetada amb partícules d'1.7 $\mu$ m, es tenen pressions d'aproximadament 15000 psi, mentre que les pressions d'un equip HPLC són de 3000 psi.

Les partícules de base de sílica presenten bona resistència mecànica però no permeten treballar en tot el marge de pH; per altra banda, les columnes de base polimèrica no tenen limitacions de pH, però tenen capacitats de càrrega i resistència molt menors. Per aquests motius, s'han desenvolupat reblerts a base de sílica en el que les molècules s'uneixen mitjançant enllaços metilènics i així ofereixen una millor resistència mecànica.

Un altre paràmetre important a considerar és el sistema cromatogràfic de bombes, el qual ha de poder operar a elevades pressions de treball. La bomba ha de ser capaç de subministrar d'una forma reproducible i sense variacions de pressió, el flux de treball. Ha de ser un cicle ràpid d'injecció, que faci front a la rapidesa de la cromatografia. Com a conseqüència d'aquesta rapidesa, els pics cromatogràfics que es generen, són de menys d'un segon d'amplada.

Això significa que la velocitat d'adquisició de dades ha de ser elevada per prendre suficients punts per poder integrar correctament.

A part de tot això els detectors han de tenir el mínim volum per continuar tenint la màxima eficàcia en el sistema. (Ventura *et al.*, 2003).

L'ACQUITY UPLC™, comercialitzat per la casa Waters, es capaç de treballar a pressions de 100MPa (1000bar, 15000psi) pot operar amb columnes d'1 o 2 mm de diàmetre intern empaquetada amb partícules d'1,7 micròmetres.

#### 2.9.4. Espectrometria de masses (MS).

La cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a l'espectrometria de masses (HPLC-MS o HPLC-MS/MS) és una tècnica analítica àmpliament utilitzada, ja que combina l'elevat poder de separació de la cromatografia, amb l'especificitat de l'espectròmetre de masses.

L'espectrometria de masses permet detectar els compostos i proporcionar informació del pes molecular i estructura de l'analit en funció de la relació massa/càrrega dels ions presents a partir de la ionització de la molècula.

S'ha descrit la utilització de la ionització química (Marquardt *et al.*, 1988) (Trucksess *et al.*, 1994), introducció directa (Abramson, 1987), *termospray* (Rajakylä *et al.*, 1987) i *particle beam* (Nesheim *et al.*, 1992) (Cappiello *et al.*, 1995) en l'anàlisi de toxines, però no han resultat ser tècniques robustes. L'aparició d'una nova tècnica de ionització, la ionització a pressió atmosfèrica, fiable, robusta i sensible, ha fet que el nombre d'articles publicats emprant aquesta tècnica de ionització amb analitzadors de quadrupol simple i triple quadrupol, hagi experimentat un notable increment (Kussak *et al.*, 1995) (Becker *et al.*, 1998) (Jorgensen i Vahl, 1999) (Tanaka *et al.*, 2002) (Bing-Chung *et al.*, 2007).

A continuació es presenta una breu descripció del funcionament d'un espectròmetre de masses. Un sistema de masses està format per una font de ionització, un analitzador, un detector i un sistema de buit.

**Font de ionització:** La font de ionització ha de produir ions en fase gas de la mostra. Un tipus de ionització a pressió atmosfèrica és l'*electrospray*.

El flux de l'HPLC entra a la interfase a través de la sonda d'*electrospray*. S'apliquen elevats voltatges (2-4 kV) a través d'un tub capil·lar metàl·lic rodejat per un flux coaxial de nitrogen (gas de nebulització) els quals converteixen l'eluent en un aerosol carregat.

Un flux de nitrogen escalfat (gas de dessolvatació) ajuda a la evaporació del solvent a través de la font. Una petita quantitat de l'aerosol es dirigeix cap a l'orifici del con de mostra i l'altre part va cap a la sortida de gasos.

Les diferències de pressió i de voltatge dirigeixen els ions a través del con de mostra cap al con d'extracció on posteriorment es dirigeixen cap a l'analitzador. A la Figura 2.18. es mostra un esquema de la interfase d'*electrospray*. La ionització per *electrosprays* pot dividir en tres etapes:

1. **Formació de les gotes carregades:** Quan s'aplica un voltatge positiu al capil·lar d'*electrospray*, les gotes emeses pel capil·lar porten un excés de càrrega positiva. L'excés de càrrega es genera electroquímicament. Quan s'aplica un voltatge negatiu al capil·lar d'*electrospray*, les gotes emeses pel capil·lar porten un excés de càrrega negativa.

2. **Evaporació del dissolvent i fissió de les gotes:** Les gotes emeses pel capil·lar d'*electrospray* disminueixen la seva mida com a conseqüència de l'evaporació del dissolvent mentre que la càrrega a les gotes es manté constant.

La disminució del radi de la gota mantenint la càrrega constant suposa un augment de repulsió entre càrregues a la superfície de la gota. A un radi determinat la repulsió de càrregues supera la tensió superficial que manté la gota unida i es produeix la fissió de la gota.

3. **Formació dels ions en fase gasosa:** Existeixen dos models per a explicar la formació dels ions a partir de gotes molt petites i altament carregades: el model d'evaporació iònica i el model de càrrega residual. El model d'evaporació iònica, és en el que a partir de gotes amb radi  $\leq 10$  nm, degut a la repulsió entre càrregues prima l'evaporació iònica a la superfície de la gota respecte a la fissió de la gota, els ions passen de solució a fase gasosa.



El model de càrrega residual mostra la fissió de la gota que produeix gotes filles extremadament petites que contenen un sol ió.

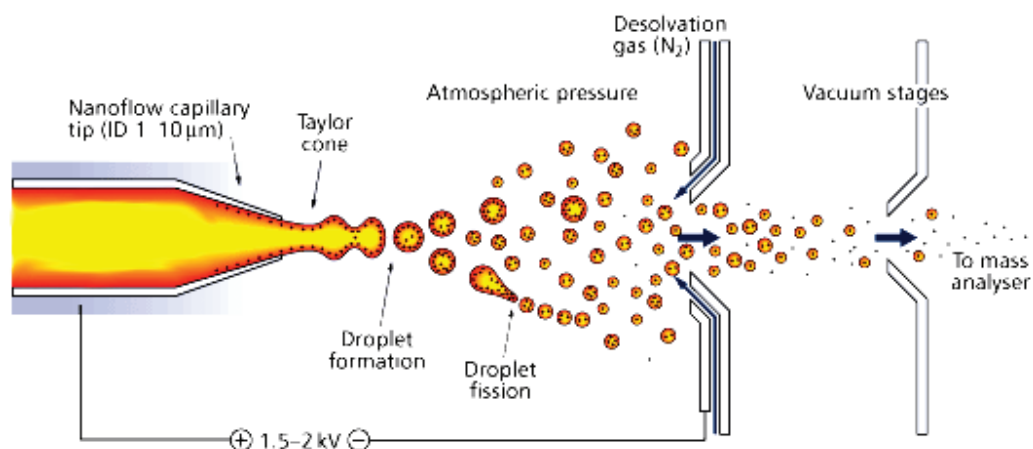


Figura 2.18. Esquema de la formació de gotes, electroespray. Font: RSC, Advancing the Chemical Sciences, [www.rsc.org](http://www.rsc.org)

La condició indispensable per a treballar amb *electrospray* és que l'analit d'interès es pugui ionitzar en solució aquosa.

És una ionització suau, és a dir, produeix molt poca fragmentació de l'ió molecular, per tant, en els espectres s'observa majoritàriament el pes molecular. El mode de detecció es pot realitzar en ESI positiu, negatiu o simultàniament els dos. Generalment compostos bàsics, com poden ser les amines, formen la molècula protonada  $[M+H]^+$  i són analitzats en mode de detecció *electrospray* positiu. Els compostos àcids poden formar la molècula desprotonada  $[M-H]^-$  i ser analitzats per *electrospray* negatiu.

Altres ions típics produïts per ionització per *electrospray* quan es treballa en mode positiu és la formació d'adductes amb sodi  $[M+Na]^+$ , potassi  $[M+K]^+$  i solvents de la fase mòbil  $[M+MeOH+H]^+$ . En mode negatiu es poden observar adductes del tipus  $[M+HCOO]^-$ .

**Analitzador:** L'analitzador és la part fonamental de espectròmetre de masses ja que separa els diferents ions en funció de la seva relació  $m/z$ . Existeixen diferents tipus d'analitzadors, però els més usats són els quadrupols per la seva facilitat d'ús, rang de masses de treball, bona linealitat per a treballs quantitius, resolució i qualitat de l'espectre de masses. Els analitzadors de quadrupol simple estan formats per dos parells de barres metàl·liques (elèctrodes) paral·leles equidistants d'un eix central (Figura 2.19).

Un parell de barres està a un potencial elèctric positiu i l'altre parell a un potencial elèctric negatiu. Una combinació de voltatges de dc (continua) i rf (radiofreqüència) s'apliquen en aquest grup de barres.

El flux dels ions entra cap al grup de barres i aquests es filtren segons la seva relació  $m/z$ . Els ions d'una determinada relació  $m/z$  seran filtrats depenent de la relació dels voltatges de dc i rf.

Per un valor donat de voltatges de dc i rf donat, només els ions d'una determinada relació de  $m/z$  ressonaran, descriuran una trajectòria estable a través del quadripol i podran ser detectats. Els altres ions seran desestabilitzats i impactaran contra les barres de metall. La resolució (capacitat de distingir entre dues masses adjacents) depèn de la geometria del quadrupol, electrònica, voltatges que s'apliquin i la qualitat en la fabricació.

La relació  $m/z$  que passa a través de les barres és proporcional al voltatge aplicat a les barres. A voltatges més elevats permet el pas de masses més elevades.

L'espectrofotòmetre es pot utilitzar en mode SIM (*single ion monitoring*) o SCAN.

En mode SIM, els paràmetres (amplitud de dc i voltatges de rf) s'estableixen per a observar una massa específica o una selecció de masses específiques. Aquest mode proporciona la màxima sensibilitat.

En mode SCAN, es fa una rampa de l'amplitud de dc i voltatges de rf (mantenint constant la relació rf/dc). Això permet obtenir l'espectre de masses en el rang de masses establert. La sensibilitat és funció del rang de masses escanejat, velocitat de scan i resolució.

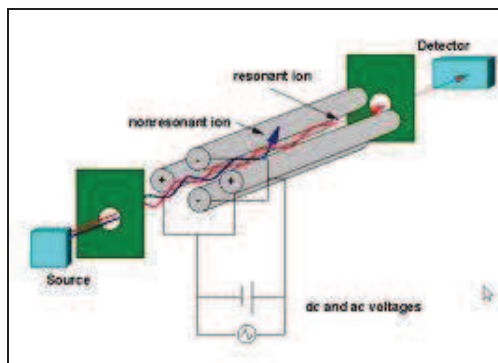


Figura 2.19. Analitzador de simple quadripol. Font: University of Bristol. School of Chemistry, [www.chm.ac.uk](http://www.chm.ac.uk).

Un altre tipus d'analitzador no tan estès, degut al seu elevat cost, són els analitzadors de triple quadripol (QQQ), els quals estan constituïts per dos quadripols separats per una cel·la de col·lisió.

En un espectròmetre de masses de triple quadripol, els ions passen des de  $Q_1$  a  $Q_2$  a alta velocitat (cel·la de col·lisió) i realitzen col·lisions amb un gas de fons (Ar,  $N_2$ ,...). Aquestes col·lisions de baixa energia, transfereixen l'energia cinètica de l'ió que entra en energia interna. L'augment d'energia interna dona com a resultat una descomposició unimolecular dels ions de l'analit. Els ions fragmentats s'analitzen al  $Q_3$ . Els espectres de masses de triple quadripol mostren típicament un ió majoritari amb els ions percussors en menor abundància.

L'energia de la col·lisió amb el gas es pot variar per tal d'obtenir diferents graus de fragmentació. Els fragments resultants són analitzats en el segon quadripol, utilitzat també en mode SIM o SCAN.

A la Figura 2.20. es mostra l'esquema d'un triple quadripol.

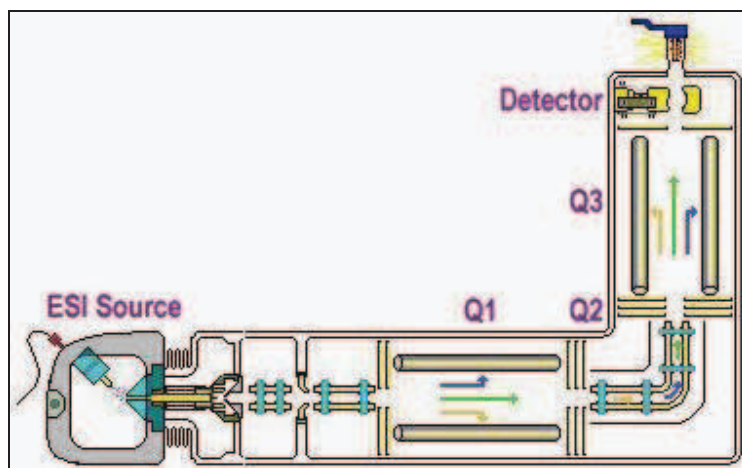


Figura 2.20. Esquema d'un espectròmetre de masses triple quadripol Font: U.S Environmental Protection Agency, [www.epa.gov](http://www.epa.gov))

Un instrument de triple quadripol pot ser utilitzat de diferents maneres, les quals s'expliquen a continuació:

1. **Constant Neutral Loss:** El primer i tercer quadripol s'utilitzen en mode SCAN.
2. **Multiple Reaction Monitoring (MRM):** Els dos quadripols operen en mode SIR, útil per a treballar amb matrius molt brutes.

3. **Daughter Ion:** El primer quadrupol opera en mode SIR i s'utilitza per seleccionar el primer ió , el qual és fragmentat a la cel·la de col·lisió generant els ions precursors (ió fill) i detectats en mode SCAN.

4. **Parent Ion:** El primer analitzador, utilitzat en mode SCAN, selecciona els ions pare. El segon analitzador, utilitzat en mode SIM, monitoritza un fragment específic.

Tenir dos analitzadors incrementa la selectivitat. El senyal de l'ió disminueix durant la transmissió, el soroll també disminueix , millorant la relació senyal/soroll.

Quan es realitza una quantificació, l'etapa de ionització, que té lloc a la font, és la més important. La presència de compostos interferents a la font poden causar efectes inesperats com la ionització d'analits interferents.

PART EXPERIMENTAL.

---

Per tal d'assolir l'objectiu de conèixer si els fongs dels gèneres *Aspergillus* i *Penicillium* són capaços de produir aflatoxines o OTA durant el procés de compostatge, la part experimental de la tesi doctoral conté la metodologia de recuperació, aïllament, cultiu i identificació dels microorganismes presents en les diferents mostres analitzades de compost procedents de diferents matèries primeres.

També conté qüestions relacionades amb els fongs potencialment micotoxigènics aïllats de les diferents mostres de compost per veure si són o no productors d'aflatoxines o ocratoxina A, mitjançant diferents tècniques cromatogràfiques. Per últim, es realitzen diferents assajos amb dues soques de fongs provinents de la Col·lecció Espanyola de Cultius Tipus i que estan descrits com a productors de toxines, *Aspergillus paraciticus* CECT 2681 i *Aspergillus ochraceus* CECT 2948, per comprovar com varia la producció d'aquests metabòlits secundaris segons quines hagin sigut les condicions a les quals s'ha sotmès la soca.

Les mostres de compost que s'analitzen són diverses: un primer grup són preses durant el procés de compostatge de les plantes de Blanes i Manresa; dues són de compost casolà en l'estadi final de la seva producció; dues més procedeixen de la planta de tractament de residu sòlid urbà de Can Barba (Vallès Occidental) i, per últim, s'analitzen dues mostres de compost procedents de femta de cavall.

Els assajos realitzats per comprovar la producció de micotoxines s'han efectuat a partir de les soques de control *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 i *Aspergillus ochraceus* CECT 2948 sobre arròs i compost. També s'ha comprovat la capacitat micotoxigènica dels fongs dels gèneres *Aspergillus* i *Penicillium* aïllats de les diferents mostres sobre els substrats esmentats anteriorment.

### 3.1. Consideracions prèvies.

#### 3.1.1. Mesures de seguretat.

En un laboratori que es treballi amb micotoxines, especialment aflatoxines i ocratoxines, cal que es tinguin en compte les següents mesures de seguretat:

- Utilitzar guants i ulleres de laboratori.
- Tot el material de vidre o plàstic que entra en contacte amb la toxina cal que sigui descontaminat amb el procés descrit per Castegnaro *et al.* l'any 1980. El material es submergeix en un contenidor que contingui una solució aquosa al 5% en hipoclorit i es deixa reposar durant 30 minuts. A continuació el pH de la solució s'ajusta entre 7.8 i 8.0 amb l'addició d'HCl (2M). Posteriorment se li addiciona la quantitat d'acetona necessària per tal de que estigui a una concentració del 5% i es deixa reposar 30 min més. Aquest procés converteix les aflatoxines en els dihidroxiderivats que no són cancerígens.

Les precaucions que cal tenir en compte per garantir la seguretat i estabilitat dels patrons són:

- És convenient que abans d'utilitzar el material, aquest es tracti amb àcid sulfúric (2M) durant varies hores i es netegi abundantment amb aigua per eliminar traces d'àcid.
- Protegir els patrons de la llum i mantenir-los entre 3 i 5°C a la foscor, utilitzant paper d'alumini o material de vidre de color topazi.



### 3.1.2. Mesures d'esterilitat.

En microbiologia és molt important treballar en condicions el més asèptiques possibles per evitar possibles contaminacions (majoritàriament d'origen ambiental) durant les anàlisis que s'efectuen.

La presència de microorganismes que contaminen l'ambient o els instruments de treball fa que sigui necessari eliminar-los; això s'aconsegueix mitjançant l'esterilització.

Per aconseguir l'esterilitat del material, en aquest treball s'utilitza l'autoclau. L'autoclau esterilitza mitjançant calor humit. Aquest s'obté per escalfament de l'aigua d'un dipòsit hermètic.

L'esterilització es duu a terme a 1 atmosfera de sobrepressió i a una temperatura de 121°C durant 30 min. El material de vidre també s'introdueix dins, embolicat en paper d'alumini. El material metàl·lic de mida petita s'esterilitza per calor directa, sotmetent-lo a la flama d'un encenedor d'etanol.

Les operacions de preparació de medis de cultiu i la manipulació de mostres, s'han realitzat a l'interior d'una cabina de flux laminar.

Els aparells que s'han utilitzat en aquest treball són:

Autoclau AUTOTESTER E 75 L (JP Selecta; IQS-MICRO-FI-0054), de 75 L de capacitat, temperatura regulable de 105 a 134°C. Temps de 0 a 60 min.

Cabines estèrils BV-100 (IQS-MICRO-FI-0019) i AH-100 (IQS-MICRO-FI-0018) (Telstar), de flux laminar d'aire vertical i horitzontal respectivament, possibilitat d'irradiació amb llum UV i una velocitat de flux d'aire de 0,4m/s.

### 3.1.3. Preparació de patrons.

En totes les anàlisis cromatogràfiques realitzades s'ha injectat també un patró d'una barreja de les aflatoxines G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> i, en alguns casos, de l'OTA. La concentració d'aquest patró injectat ha variat segons la sensibilitat de l'equip o de la tècnica utilitzades.

Les dilucions dels patrons s'han realitzat sempre a partir d'una dissolució mare de patró preparada a partir de 5 mg d'aflatoxina G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> (Sigma-Aldrich) per separat en matrassos aforats de 50 ml amb metanol qualitat HPLC (Merck). La concentració de cada una de les dissolucions mare de les aflatoxines és de 100 mg/L.

La dissolució mare d'ocratoxina A s'obté dissolent 10 mg de toxina (Sigma-Aldrich) en 100 mL d'acetonitril qualitat HPLC (Merck). La concentració de la dissolució mare és de 100 mg/L.

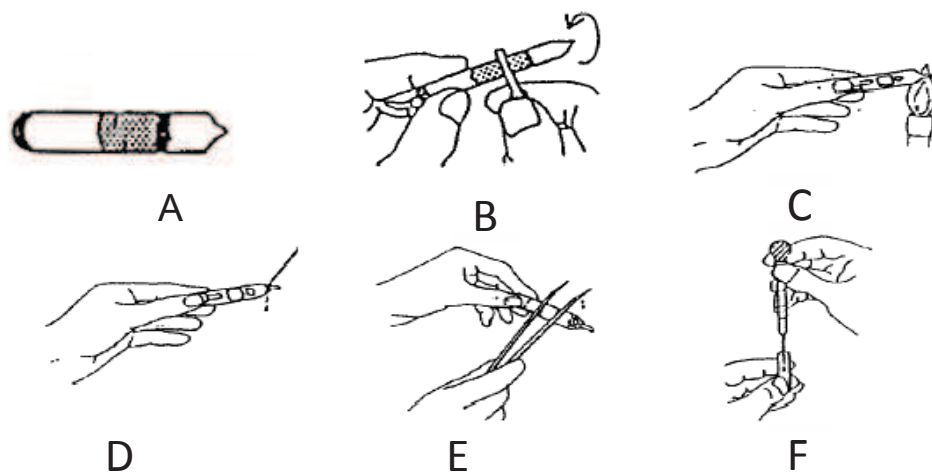
La dilució per a preparar el patró de la barreja d'aflatoxines sempre s'ha realitzat amb una mescla MeOH:H<sub>2</sub>O de proporció (70:30) en el mètode d'extracció dels cartutxos o bé (60:40), proporció de la fase mòbil del gradient inicial en els mètodes utilitzats en cromatografia líquida.

### 3.1.4. Recuperació de soques liofilitzades.

L'etapa inicial consisteix en recuperar les soques liofilitzades obtingudes a partir d'un banc de cultius.

En la present tesis doctoral es treballarà amb dues soques de col·lecció, la soca *Aspergillus ochraceus* CECT 2948 i la soca *Aspergillus parasiticus* CECT 2681, procedents de la Col·lecció Espanyola de Cultius Tipus, descrites com a productora d'OTA i de les aflatoxines B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i G<sub>2</sub> respectivament. La soca liofilitzada es subministra dins d'una ampolla de vidre. Per recuperar-la, amb l'ajuda d'una llima, es fa un traç profund a la part superior de la zona del tub que conté el cotó. Per tal de provocar l'entrada d'aire al liòfil, s'escalfa a la flama la punta de l'ampolla i es deixen caure unes gotes d'aigua estèril sobre la mateixa perquè el vidre s'esquerdi.

Si el tub no es trenca per la zona ratllada es dóna un cop sec amb unes pinces. Immediatament després d'obrir l'ampolla, s'afegeixen en condicions estèrils de 0.2 a 0.3 ml de brou extracte de malta amb una pipeta Pasteur i es resuspèn el liòfil, evitant la formació de bombolles d'aire tal i com il·lustra la Figura 3.1.



**Figura 3.1.** Esquema de recuperació de soques liofilitzades (Font: Col·lecció Espanyola de Cultius Tipus).

Es sembra la soca en plaques Petri d'agar patata glucosa i s'incuben a 27°C en atmosfera aeròbia durant 14 dies.

Transcorregut el temps d'incubació es realitzen dues preparacions en fresc, una de cada soca recuperada per ser observades al microscopi òptic. Per fer-ho, es diposita una gota d'aigua desionitzada en un portaobjectes. Amb una nansa de Kolle, prèviament esterilitzada a la flama del Bunsen, es diposita una mostra de fong sobre l'aigua. Es cobreix amb el cobreobjectes i es passa a observar al microscopi. Les descripcions fenotípiques tant macroscòpiques com microscòpiques de les dues mostres coincideixen amb les descrites en els tractats de Raper i Fennell (1965) i Samson *et al.* (2000), la qual cosa porta a la confirmació que es treballarà amb el cultiu recuperat correctament.

### **3.2. Tipus de mostres.**

Les depuradores de Blanes i Manresa tenen diferents maneres de produir el compost. Aquest fet fa que la naturalesa de les mostres procedents d'un i altre lloc sigui diferent.

La tipologia d'ambdós tipus de mostres és descrita als apartats 3.2.1 i 3.2.2 junt amb el seu procés de producció. A l'apartat 3.2.3 s'inclou l'explicació de la producció del compost casolà produït a Pineda de Mar. Per últim als apartats 3.2.3 i 3.2.4 s'expliquen els sistemes de producció del compost de Can Barba procedent de Residu Sòlid Urbà i el sistema de producció d'adob de cavall a partir de femta de cavall.

#### **3.2.1. Sistema de producció de Blanes i el seu compost.**

La depuradora de Blanes és del tipus biològic. Un cop separat el fang de les aigües, aquestes són tornades al riu Tordera després d'haver rebut el tractament adient.

La totalitat dels fangs primaris (si n'hi ha) i una part dels fangs secundaris, excessivament líquids per als usos posteriors que se'n puguin derivar, es concentren i deshidraten (moltes vegades amb una fase prèvia de digestió).

L'espesseïment dels fangs s'aconsegueix introduint-los en un dipòsit decantador (anomenat espesseïdor) on, en el cas dels fangs primaris, es concentren al fons per gravetat. Els fangs biològics o secundaris pel fet de ser més lleugers, es poden concentrar en un dipòsit espesseïdor diferent, per sistema de flotació, se'ls concentra i recull, superficialment, mitjançant la generació de bombolles molt fines d'aire. L'extracció o purga dels fangs del fons dels dipòsits decantadors s'efectua a través del bombejament de purga de fangs.

Els fangs produïts tenen un volum considerable, tot i així però, s'han d'evacuar. En algunes variants d'aquest procés es poden tractar novament amb la intenció de reduir-ne el volum. Un cop espesseït el fang, s'envia als dipòsits anomenats digestors on s'efectua la digestió anaeròbia del fang; una part dels compostos orgànics es transformen en metà i altres gasos i s'aconsegueix reduir la proporció en matèria orgànica. Part d'aquest gas s'empra directament per a la calefacció dels digestors per mantenir-los entre 30 i 37°C durant un període mínim de 25 dies.

El fang passa a continuació a l'etapa de deshidratació, on se n'elimina la major part d'aigua mitjançant centrifugació, per fer-lo menys voluminós i més econòmic de transportar i transformar.

En aquesta planta de compostatge, el compost es produeix en piles estàtiques airejades. Un cop el fang deshidratat s'ha barrejat amb estelles de pi es diposita en túnels especials que airegen la mescla a través d'orificis presents al terra, aquest procediment dura 15 dies. Posteriorment, es separen les estelles des de 20 a 10 mm per aprofitar-les per altres processos de compostatge. Finalment, es trasllada el fang a l'àrea de maduració on s'hi estarà d'un a tres mesos amb volteig ocasional.

En aquest treball, s'han analitzat un total de sis mostres procedents de la planta de Blanes, una correspon a l'inici del procés dins del túnel (B inici), la següent és del final del túnel (B final túnel), la tercera és als 15 dies de maduració (B15), la quarta a un mes de maduració (B1mes), la penúltima és als dos mesos de maduració (B2mesos) i l'última és del compost final (B3mesos). A la Figura 3.2. es mostra el compost final de la depuradora de Blanes



Figura 3.2. Fotografia del compost final de la depuradora de Blanes obtingut l'any 2007

### 3.2.2. Sistema de producció de Manresa i el seu compost.

La planta de compostatge de Manresa és del tipus aeròbic, també anomenat no intensiu (obert o de piles). La planta composta el seu fang deshidratat i també fang provinent d'altres depuradores.

A la depuradora de Manresa, un cop s'ha separat el fang de les aigües depurades, aquest entra a la línia de fangs i es sotmet primer a un procés aeròbic i després a un altre d'anaeròbic. El fang digerit es deshidrata a través d'un filtre banda, obtenint el fang deshidratat. A partir d'aquest fang deshidratat s'obté el compost.

El compostatge es fa en canals, per això quan es té la barreja del fang amb les estelles de pi (el fang també es barreja amb residus de cafè) entra al túnel de compostatge i es va remonent i airejant fins que als 15 dies arriba al final del túnel. Dins dels túnels el compostatge és continu, ja que va entrant mescla nova a l'inici del canal de manera constant.

Finalment la mescla compostada és traslladada a l'exterior on estarà durant tres mesos en forma de pila a temperatura ambient. Durant aquesta etapa de maduració, la temperatura i el pH s'estabilitzen. Si el pH és àcid indica que el compost encara no està madur. Els actinomicets adquireixen especial importància en la formació d'àcids húmics i són freqüentment productors d'antibiòtics que inhibeixen el creixement de bacteris i altres patògens. El color del producte final ha de ser negre o marró fosc i la seva olor a terra de bosc.

És necessari assegurar l'aireació a través d'un volteig mecànic ocasional i la humitat a través d'addició d'aigua quan sigui necessari. En aquesta etapa es donen reaccions secundàries de condensació i polimerització de l'humus.

Al final del procés de compostatge, el volum del fang es redueix fins un 50% en volum i un 40% en pes. Per contra, la matèria orgànica i els contaminants no biodegradables es concentren. Per això és important saber la qualitat del fang de partida, perquè la qualitat del compost disminuirà com més contaminants tingui i més tòxics siguin.

Quan el compost ja està madur, es fan les següents operacions per a finalitzar-lo:

- Pas a través d'un garbell rotatiu de xarxa estreta que separa el compost ja fet de les partícules grans.
- En el mateix garbell rotatiu hi ha un aspirador o cicló incorporat que s'emporta les petites partícules de plàstic que encara hi pugui haver i que es portaran a l'abocador.

Finalment, el compost ja elaborat passa per una taula on per vibració es separen les partícules més pesants com poden ser trossos petits de vidre, metalls, pedretes. Una vegada el compost s'ha refinat ja està a punt per a ser utilitzat com a adob.

En aquest estudi, s'han analitzat un total de set mostres procedents de la planta de compostatge de Manresa. Una correspon a l'inici del túnel (Minici), després s'analitza una mostra de la meitat del túnel (Mmeitat túnel), la següent és del final del túnel (Mfinal túnel), la quarta és als 15 dies de maduració (M15), la cinquena a un mes de maduració (M1mes), la penúltima és als dos mesos de maduració (M2 mesos) i la última és del compost final (M3 mesos).

A la Figura 3.3. es pot veure una mostra del compost de Manresa final.



Figura 3.3. Mostra del compost final de la depuradora de Manresa l'any 2007

### 3.2.3. Sistema de producció casolà i el seu compost.

El compost analitzat en aquest treball ha estat produït a la zona del Maresme a partir de, majoritàriament, residus vegetals de cuina i restes de menjar. També conté una petita part de gespa segada.

Aquest compost s'ha elaborat dins un compostador per resguardar-lo de les inclemències del temps, per evitar que es ressequi o s'humitegi excessivament.

El temps que s'espera per tal d'obtenir el compost sol ser des de 5 mesos a un any. Passat aquest període, el seu aspecte és el d'una terra de color negre o marró fosc, que taca molt poc les mans perquè no és gaire humida, i no s'hi reconeix cap resta de la matèria orgànica que s' havia abocat al compostador.



En el present treball, s'han analitzat dues mostres de compost casolà en el seu estadi final.

### **3.2.4. Sistema de producció de la planta de Can Barba partir de residu sòlid urbà.**

La Planta de biometanització i compostatge de Can Barba es troba situada al terme municipal de Terrassa. Aquesta planta té una capacitat per tractar 20.000 t/Any de fracció orgànica del residu municipal, obtenint compost i biogàs. La producció de biogàs és molt important ja que permet l'autogestió energètica de la planta i la venda de l'energia que sobra a la xarxa elèctrica.

El procés de producció de la planta de Can Barba comença amb una fase de pretractament on es seleccionen els residus i s'homogeneïtzen per a ser conduïts al mòdul de biometanització mitjançant una cinta transportadora. Allà es realitza una digestió anaeròbica de la matèria orgànica inferior a 40 mm de diàmetre de partícula a temperatura termòfila (50-55°C).

El resultat és un digest que serà compostat aeròbicament. De la biometanització i el compostatge s'obté el biogàs. El procés de compostatge que es duu a terme és l'anomenat procés mixt i consta de dues fases: una fermentació controlada de la matèria orgànica en túnels i una posterior maduració també controlada per voltejadores.

El digest resultant de la biometanització es barreja amb matèria orgànica superior a 40 mm de diàmetre i s'homogeneïtza, s'introdueix dins dels sis túnels que té la planta per començar la fermentació aeròbica durant set dies.

Els túnels estan aprovisionats de petits forats per on circula l'aire, i les condicions d'humitat, temperatura, nivell d'oxigen, etc. de tots ells són controlades a través de sensors.

La zona de maduració conté quatre piles de compost i serveix per acabar d'estabilitzar el producte obtingut després de la fermentació aeròbica. Les piles són voltejades amb una periodicitat d'un o dos dies, fins que els paràmetres controlats, sobretot la temperatura, s'estabilitzen.

Finalment, el compost serà sotmès a una etapa de refinament que consta de dues fases: la fase de cribratge i la fase de separació per densitat de partícules.

La fase cribratge es realitza mitjançant vibració; les partícules de menor mida de partícula són conduïdes a la taula del densímetre on s'eliminen elements com plàstics, pedres, etc. Per acabar el compost s'emmagatzema per a la seva posterior comercialització. ([www.ccvoc.org](http://www.ccvoc.org)).

A la present Tesis doctoral s'han analitzat dues mostres de RSU compostat anomenades RSUfinal.

### **3.2.5. Sistema de producció de compost de cavall a partir de fems de cavall.**

El compost de cavall aporta uns nutrients molt importants pel sòl, és per aquest motiu que la seva utilització com a adob aporta als ramaders una font extra d'ingressos. La seva composició resulta diferent segons la proporció de fems i d'altra matèria orgànica utilitzada.

Els fems de cavall com a adob es poden utilitzar bàsicament de dues maneres diferents: la primera és apilar-los i escampar-los al camp sense barrejar-los amb cap més material i la segona és barrejar-los en diferents proporcions i materials com restes de gespa, fulles de jardí i deixalles orgàniques.

El compost de fems de cavall, s'obté combinant diferents quantitats de femta de cavall i en molts casos també de vaca amb diferents proporcions de restes de poda. La temperatura es sol mantenir constant a 50°C durant tres setmanes. El producte es dona per acabat al cap d'un mes i mig. El compost final s'homogeneïtza i s'obté una mida de partícula que en facilita la seva aspersió pel camp i el bon creixement de les plantes en testos ([www20.gencat.cat](http://www20.gencat.cat)).

En el transcurs del treball s'ha analitzat una mostra procedent de fems de cavall en l'estadi final de la seva producció, CCfinal.

**3.2.6. Recull de les mostres de fang de depuradora urbana i de composts finals procedents de diferents matèries primeres.**

En la present tesi doctoral s'han analitzat un total de 18 mostres. Tretze mostres han estat preses en el transcurs de la producció del compost durant l'any 2007. Un total de set mostres procedien de la planta de compostatge de Manresa i 6 de la planta de Blanes. Dues mostres de Compost Casolà final obtingudes l'any 2008, una de compost procedent de fems de cavall adquirida l'any 2009 i dues de compost procedents de residu sòlid urbà que procedien de la planta de Can Barba recollides els anys 2009 i 2010.

### 3.3. Anàlisi microbiològica de les diferents mostres de fang i dels compost finals.

Per dur a terme l'anàlisi, el primer que es realitza és la selecció del medi de cultiu adient per aconseguir que les condicions de creixement que s'ofereixen als fongs siguin el més adequades possible. A l'apartat 3.3.1, es descriu amb detall el medi de cultiu seleccionat (Agar extracte de malta 2%) perquè creixin els fongs filamentosos objectes del nostre estudi.

#### 3.3.1. Elecció del medi de cultiu.

Un dels sistemes més estesos per a la identificació de microorganismes és observar el seu creixement en medis de cultiu preparats al laboratori. El medi de cultiu conté tots els nutrients que necessitarà el microorganisme per desenvolupar-se correctament i ha d'estar exempt de tot microorganisme contaminant.

Perquè els microorganismes creixin correctament en un medi de cultiu aquests s'han d'incubar, en les condicions ambientals òptimes per al seu creixement, tenint en compte la temperatura, el grau d'humitat així com el pH adequat.

Els fongs són microorganismes que es desenvolupen en substrats que contenen aigua i matèria orgànica. Es pot dir que, en general, no tenen requeriments nutricionals estrictes i que es poden alimentar d'una gran varietat de substrats. Com a font d'energia i per a la síntesi d'àcids nucleics i proteïnes utilitzen el carboni que pot provenir de carbohidrats simples i o complexos.

El medi de cultiu que s'ha utilitzat per realitzar el treball és agar extracte de malta al 2%. És sòlid i conté els ingredients que es descriuen a continuació. Les quantitats que es mostren a continuació són per 0,5 L d'aigua.

**Agar-Agar** (10 g), polisacàrid sense ramificacions obtingut de la paret cel·lular de diverses espècies d'algues vermelles. Químicament, és un polímer de subunitats de galactosa. Es dissol en aigua calenta i quan es refreda es torna gelatinós.

L'agar-agar és un solidificant que s'utilitza en la majoria dels medis de cultiu, no té valor nutritiu per als microorganismes. S'usa tant per al creixement de bacteris com pel de fongs.

**Peptona** (0,5 g), és una barreja complexa de productes resultants de la hidròlisi de la carn. És font de nitrogen i de carboni en menor proporció.

L'utilitzen molts microorganismes que no solen utilitzar directament les proteïnes, però que en canvi tenen capacitat d'assimilar els aminoàcids i altres compostos més simples de nitrogen presents en la peptona.

**Extracte de malta** (10 g), és font de carboni i és essencial per aportar els microelements que requereix el fong per desenvolupar-se.

**Glucosa** (10 g), és un sucre, concretament un monosacàrid, un dels glúcids més senzills. Els microorganismes n'obtenen el carboni. És pot dir que n'és la font principal.

**Clorhidrat d'oxitetraciclina**, 30 ppm d'aquest antibiòtic d'ampli espectre. Inhibeix només el creixement bacterià, deixant créixer els fongs filamentosos i els llevats. Els fongs filamentosos són l'objecte del nostre estudi.

### 3.3.2. Recompte de floridures presents en les diferents mostres analitzades.

El nombre de fongs d'una població es pot determinar utilitzant diferents tipus de mètodes. En aquest treball, s'ha optat per realitzar el recompte de fongs viables, és a dir, aquells que seran capaços de multiplicar-se i formar una colònia. Per això s'ha realitzat un banc de cinc dilucions seriades decimals de cada mostra, banc que s'ampliava per a les mostres més contaminades.

El mètode de les dilucions és una tècnica que té una doble finalitat: d'una banda aconseguir colònies aïllades a partir d'una mostra i d'altra banda, permetre estimar la quantitat d'unitats formadores de colònia (ufc) presents.

La unitat colònia no és una classificació taxonòmica, sinó funcional. En cas dels microorganismes, es considera que cada colònia prové d'un microorganisme diferent, d'una única cèl·lula, que utilitza el medi de cultiu com a font nutritiva per a reproduir-se. Gràcies a aquest fet, és produeix una unitat (colònia) diferenciable de les altres que hi ha a la placa i es pot efectuar el recompte.

El nombre total de ufc s'obté mitjançant una mitjana aritmètica ponderada de totes les plaques en les quals s'ha obtingut un recompte vàlid de colònies.

L'equació 3.1, on el número de colònies és el que es compta a la placa, D correspon a la dilució de la placa on s'han comptat les colònies i V inòcul és el volum de mostra sembrat a la placa és la que s'utilitza per efectuar el càlcul de les ufc.

$$ufc = \frac{\text{Número Colònies}}{D * V_{inòcul}}$$

Equació 3.1. Unitats formadores de colònies.

Per a dur a terme el recompte, s'ha d'aconseguir una suspensió de microorganismes a partir de la mostra inicial, amb un grau de dilució que ens permeti, a partir de la sembra d'un volum concret en placa, tenir una quantitat de colònies suficientment separades i que es puguin comptar (és a dir, no tenir creixement confluent o en gespa) i que es trobin dins dels marges preestablerts.

En el cas dels fongs, es considera que una sembra és adequada per aquesta fi quan a la placa s'hi desenvolupen entre 10 i 100 colònies.

## PART EXPERIMENTAL I DISCUSSIÓ DE RESULTATS

Per a realitzar el recompte de floridures de les mostres analitzades en aquest treball, s'ha seguit el procediment que es descriu a continuació:

Es pesen 25 g de cada mostra de compost i es suspenen en 225 ml de solució salina estèril (0,85% NaCl en aigua) obtenint la dilució  $10^{-1}$ . A continuació s'efectua el banc de dilucions disposant de tubs d'assaig que contenen 9 ml de sèrum fisiològic estèril (0,85% NaCl). Mitjançant una pipeta estèril es pren 1 mL de la dissolució  $10^{-1}$  i es disposa en el primer tub obtenint la dilució  $10^{-2}$ . S'agita fins a aconseguir una suspensió homogènia. Es repeteix el procediment fins a preparar tot el banc de dilucions. De cada tub se'n sembren 0,1 ml en sis plaques de petri que contenen el medi de cultiu òptim per fer créixer els microorganismes en el nostre cas, agar extracte de malta al 2%.

La Figura 3.4. il·lustra el procediment utilitzat per a realitzar el banc de dilucions.

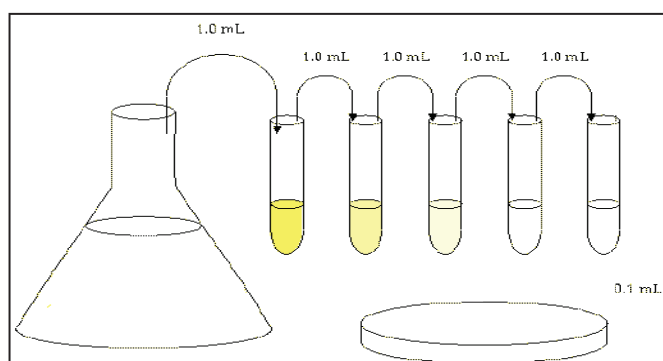


Figura 3.4. Esquema per a la realització d'un banc de dilucions.

Un cop obtingut el banc de dilucions amb la pipeta estèril es pren 0.1 ml de la suspensió de la mostra. Es destapa lleugerament la placa i es disposen sobre el medi, centrats. A continuació es pren la nansa de Digralsky, es submergeix en alcohol i es porta a la flama del bec bunsen, s'aparta i es deixa que es consumeixi l'alcohol.

Es deixa refredar una mica i, destapant el mínim la placa de petri, s'hi introdueix la nansa i es distribueix uniformement la mostra per la superfície del medi fins que la nansa no llisca. S'inverteix la placa per portar-la a incubar. En aquest treball s'han sembrat totes les dilucions sis vegades i s'han portat a incubar les plaques en posició invertida a 27°C (creixement dels fongs mesòfils) i a 55°C (creixement dels fongs termòfils) durant 7 dies. Transcorregut aquest temps es compten les colònies tenint en compte que s'han sembrat 0.1 ml.

De les sis plaques sembrades per a cada dilució, tres s'incuben a 27°C, per a comprovar el creixement dels microorganismes mesòfils i tres a 55°C, per a comprovar el creixement dels termòfils. Les plaques s'incuben durant 7 dies.

Passat el temps d'incubació es passarà a comptar el número de colònies desenvolupades a cada placa i es calcularan les unitats formadores de colònia (ufc) segons l'equació 3.1.

A la Figura 3.5. es pot observar el resultat de la sembra de la mostra de compost de Manresa per a cada una de les dilucions en solució salina estèril realitzada, de  $10^{-1}$  fins a  $10^{-5}$  sembrat sobre agar extracte de malta al 2%. La incubació s'ha realitzat a 27°C durant 7 dies.



Figura 3.5. Sembra de la mostra de compost de Manresa per a cada una de les dilucions realitzades des de  $10^{-1}$  fins a  $10^{-5}$  sembrat sobre agar extracte de malta, incubat a 27°C durant 7 dies.

Els fongs detectats a partir de les mostres obtingudes en els processos de compostatge d'ambdues plantes (Blanes i Manresa) i en els diferents sistemes de producció dels compostos finals procedents de diferents matèries primeres, els fongs presents són en la seva major part mesòfils.



## PART EXPERIMENTAL I DISCUSSIÓ DE RESULTATS

A la Taula 3.1. es mostren els resultats de les plaques incubades a la temperatura de 27°C. En el cas de les plaques incubades a 55°C, en tots els casos es va obtenir un recompte d'ufc/placa inferior o igual a 10.

<b>Mostra T= 27°C</b>	<b>ufc/ g</b>	<b>n=3 DesVest %</b>
<b>Minici</b>	$1.1 \times 10^7$	14,14
<b>Mmeitat túnel</b>	$3.0 \times 10^5$	10,60
<b>Mfinal túnel</b>	$5.1 \times 10^4$	4,94
<b>M15 dies</b>	$9.5 \times 10^3$	0,70
<b>M1mes</b>	$2.7 \times 10^4$	3,53
<b>M2 mesos</b>	$6.8 \times 10^5$	2,82
<b>Mfinal</b>	$8.0 \times 10^5$	12,02
<b>Binici</b>	$3.2 \times 10^5$	9,19
<b>Bfinal túnel</b>	$2.4 \times 10^4$	8,48
<b>B15 dies</b>	$4.4 \times 10^5$	7,77
<b>B1mes</b>	$8.1 \times 10^5$	11,31
<b>B2 mesos</b>	$8.2 \times 10^5$	10,60
<b>B final</b>	$1.5 \times 10^6$	7,77
<b>Casolà 1</b>	$>10^8$	
<b>Casolà 2</b>	$>10^8$	
<b>RSU 1</b>	$6,35 \times 10^3$	4,94
<b>RSU 2</b>	$1,35 \times 10^4$	9,19
<b>CC</b>	$<10$	

Taula 3.1. Resultat de les ufc per a cada mostra analitzada. M: mostres de Manresa, B: mostres de Blanes, Casolà: compost casolà, RSU: Residu sòlid urbà i CC: Compost de cavall

Com es pot veure a la Taula 3.1, els valors de les ufc/g segueixen una tendència decreixent en ambdues tipologies de compost des del fang deshidratat inicial fins a l'inici de l'etapa de maduració (B15, M15); moment en què les ufc/g augmenten progressivament fins arribar al compost final (B3 mesos, M3mesos de maduració).

Es pot observar com els fangs de depuradora que arriben a la planta de compostatge de Manresa contenen més fongs que els que arriben a la planta de Blanes, malgrat això, un cop el compost ha arribat als 3 mesos de maduració, conté més microorganismes el de Blanes que el de Manresa.

El compost casolà és el que presenta el valor més elevat d'ufc, seguit del de Manresa, el de Blanes, el Compost RSU i finalment, pel compost procedent de fems de cavall (CC).

### 3.4. Identificació dels fongs presents a cada mostra de fang i dels composts finals a nivell de gènere segons l'observació macroscòpica i microscòpica de les colònies.

A continuació, es presenta com s'han identificat els fongs de les diferents mostres analitzades tenint en compte les seves característiques microscòpiques i macroscòpiques. Val a dir que cada fong té uns trets diferencials concrets que ajuden a realitzar la identificació.

La primera identificació que s'ha efectuat de les diferents plaques de cada mostra ha estat a nivell visual. Des d'un punt de vista morfològic, es poden estudiar les característiques de les colònies, la seva mida, aspecte dels marges (llis, rugós, ondulat, ramificat, etc.), presència de brillantor, color, etc. Aquestes característiques però són molt subjectives i estan sotmeses a moltes variacions, depenen del grau de desenvolupament del fong i de les condicions en què aquest ha crescut. Per això és molt important l'estandardització del medi de cultiu i les condicions d'incubació en les que creixeran els fongs per a ser identificats.

Per observar les característiques microscòpiques, es realitza una preparació en fresc que s'observa amb el microscopi òptic. Per fer-ho, es disposa una gota d'aigua desionitzada en un portaobjectes. Amb la nansa de Kolle, es pren una petita part del fong que es disposa sobre la gota d'aigua. Es cobreix amb un cobreobjectes i s'observa al microscopi, normalment fins a uns augments de x400 o x1000.

Un cop s'han identificat els fongs, es conserven els que tenen capacitat potencial reconeguda de produir les toxines d'interès per al nostre estudi, concretament els del gènere *Aspergillus* i *Penicillium*. Per fer-ho, es resembren els fongs en el mateix medi de cultiu que s'ha utilitzat per sembrar cada una de les mostres inicials, per tal d'obtenir una colònia provinent d'un únic microorganisme. Els cultius s'incuben durant 7 dies a 27°C i passat el temps d'incubació, es comprova que els cultius siguin purs mitjançant microscòpia i es sembren en arròs segons el mètode recomanat per la Food and Drug Administration i que es descriu a l'apartat 3.5.1.

Per a realitzar la identificació dels gèneres de fongs presents en les mostres analitzades, és realitzen dos passos: el primer és observar la colònia macroscòpicament i el segon es realitzar una preparació en fresc del cultiu i observar-lo al microscopi. A continuació es presenten els fongs identificats amb una explicació dels detalls macroscòpics i microscòpics característics de cada un d'ells.

S'acompanya l'explicació amb una o bé dues figures. Així, sempre es mostra el dibuix del fong que s'ha observat al microscopi i, en alguns casos, l'aspecte macroscòpic de les colònies aïllades i fotografiades al laboratori. El text utilitzat per a poder identificar el fong a partir de les dades de les colònies i de l'observació realitzada al microscopi ha estat "Illustrated genera of imperfect fungi" (Barnett et Hunter *et al.*, 1972).

1.-***Aspergillus*** Característiques macroscòpiques: Les colònies presenten tonalitats variades: blanquinoses, grogues, negres, verdes en créixer sobre agar extracte de malta al 2% a 27°C incubat durant 5-7 dies.

Característiques microscòpiques: S'observa un miceli a la base del qual es poden diferenciar els conidiòfors. La vesícula, els fiàlids i les mètules, si existeixen, formen el denominat cap conidial juntament amb els conidis que s'originen a partir dels fiàlids. Els conidis originen cadenes que poden ser compactes o divergents, són unicel·lulars de mida variable i poden ser lleugerament pigmentats

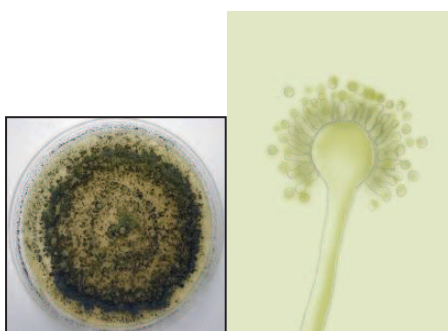


Figura 3.6. *Aspergillus*. Colònia sobre agar i dibuix del fong observat al microscopi.

2.-**Mucor** Característiques macroscòpiques: El color de les colònies és blanquinós a l'inici, amb el temps canvia a marró. El revers de la colònia és blanquinós. Al ser incubat en PDA (Potato Dextrose Agar) durant 5-7 dies a 27°C. La textura és semblant al cotó fluix.

Característiques microscòpiques: Les hifes són majoritàriament hialines o poden ser pigmentades en algunes espècies. Les zigospores no tenen apèndixs.



Figura 3.7. *Mucor*. Colònia sobre agar i dibuix del fong observat al microscopi.

3.-**Penicillium**. Característiques macroscòpiques: Generalment són de color verd, a vegades poden prendre tonalitats blanques o grogues, fins i tot vermelloses, al ser incubat en Agar extracte de malta al 2% durant 7 dies a 27°C. La textura de les colònies pot ser polsosa, llanosa, vellutada, depenent d' on neixin els conidis.

Característiques microscòpiques: Miceli de base molt dens a partir del qual es diferencien els conidiòfors. Els pinzells estan constituïts per fiàlids, mètules i branques. La disposició i número d'aquestes estructures són criteris taxonòmics fonamentals per a la diferenciació a nivell d' espècie. A partir dels fiàlids s'originen els conidis que són hialins o lleugerament pigmentats i poden tenir les parets llises o rugoses.

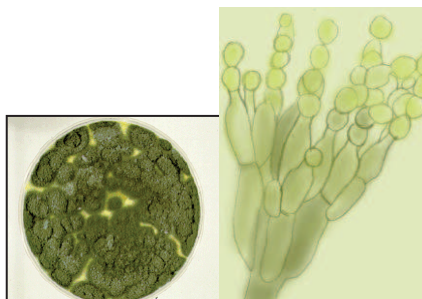


Figura 3.8. *Penicillium*. Colònia sobre agar i dibuix del fong observat al microscopi.

4.-**Cladosporium**. Característiques macroscòpiques: Colònies de color verd, marró o gris. Són de textura vellutada i, si es dóna molta formació de conidis, poden prendre un aspecte polsós al ser incubat en PDA durant 10 dies a 25°C. El revers de les colònies és molt fosc, sent aquest un dels trets diferencials més importants.

Característiques microscòpiques: Els conidis es troben en cadenes llargues i curtes, aquests són de morfologia diversa i de parets llises o rugoses segons l'espècie. Les cadenes de conidis són molt fràgils.



Figura 3.9. *Cladosporium*. Dibuix del fong observat al microscopi.

5.-**Fusarium**. Característiques macroscòpiques: Les colònies creixen cobrint la placa de petri i poden prendre des de colors de tonalitats suaus, com per exemple blancs i cremosos, o bé colors més vius com roses o vermells al ser incubat sobre PDA durant 6 dies a 25°C.

Característiques microscòpiques: La característica microscòpica més rellevant és la forma i la mida dels conidis. Els macroconidis tenen forma de falç i són multiseptats. Els microconidis són generalment unicel·lulars i prenen formes corbades o ovoides.

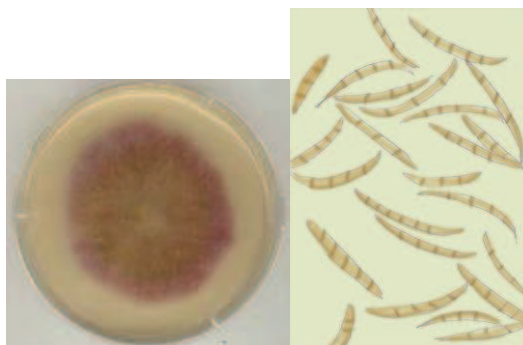


Figura 3.10. *Fusarium*. Colònia sobre agar i dibuix del fong observat al microscopi.

6.-***Geotrichum***. Característiques macroscòpiques: Colònies que creixen ràpid i que presenten un color blanc gris al ser incubades en PDA durant 7 dies a 27°C. Moltes vegades aquest color de les colònies pot canviar a groc.

Característiques microscòpiques: No tenen conidiòfors. Els conidis són unicel·lulars i es disposen en cadenes, aquestes són fruit de la fragmentació d' hifes no diferenciades.

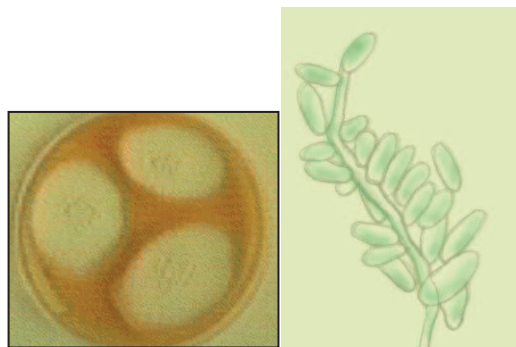


Figura 3.11. *Geotrichum*. Colònia sobre agar i dibuix del fong observat al microscopi.

7.-***Rhizopus***. Característiques de les colònies: Inicialment són blanques, però després poden adoptar tonalitats grises al ser incubades sobre Agar Sabouraud durant 5 dies a 25-27°C.

Característiques microscòpiques: El miceli no té septes. Els esporangis són generalment de mida gran. La columella és de color marró. Els conidis tenen forma el·líptica, amb nombroses estries a la superfície i presenten angles irregulars.



Figura 3.12. *Rhizopus*. Dibuix del fong observat al microscopi.

8.-**Absidia**. Característiques macroscòpiques: les colònies es desenvolupen al ser incubades sobre Agar Sabouraud als quatre dies d'incubació, a 27°C, ocupant la totalitat de la placa de Petri. Són colònies de textura semblant al cotó fluix, de colors que viren del blanc al cru.

Característiques microscòpiques: Els esporangiòfors són hialins o pigmentats, segons l'espècie, poden tenir les parets llises o lleugerament rugoses. La seva columnella és hialina i pren una forma que pot ser globosa o ovoide.



Figura 3.13. *Absidia*. Dibuix del fong observat al microscopi.

9.-**Acremonium**. Característiques macroscòpiques: Les colònies tenen un creixement molt lent. Aquestes presenten un aspecte cremós de textura suau, el seu color habitual és el verd virant a groc i gris a mesura que passen els dies d'incubació. El medi de cultiu utilitzat és l'Agar Sabouraud i s'incuben a 28°C durant 4-6 dies. El revers és de color marró, amb pigments foscos que difonen en el medi.

Característiques microscòpiques: Els conidis són generalment unicel·lulars. S'agrupen entre ells als extrems dels fiàlids, gràcies a una substància enganxosa, en forma de pilota. El conidiòfor presenta fiàlids llargs i rectes que acaben amb forma de punta.

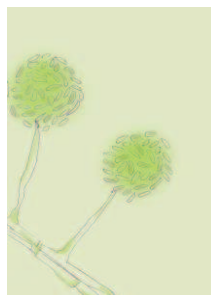


Figura 3.14. *Acremonium*. Dibuix del fong observat al microscopi.

10.-**Trichoderma**. Característiques macroscòpiques: Les colònies inicialment són blanques i amb textura de cotó fluix; quan ja són madures es tornen de color verd fosc. És habitual observar colònies ratllades, alternant una banda prima i incolora amb una altra d'ampla i de color verd fosc, al ser incubades sobre PDA durant 5 dies a 25°C.

Característiques microscòpiques: Els conidiòfors són molt ramificats i formen grups de fiàlids. Els conidis són unicel·lulars i formen uns agregats molt característics. Són de parets llises o rugoses. Moltes espècies formen clamidòspores terminals.

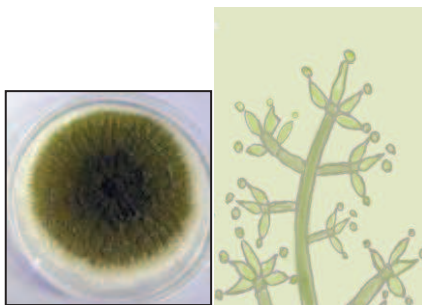


Figura 3.15. *Trichoderma*. Colònia sobre agar i dibuix del fong observat al microscopi.

11.-**Nigrospora** Característiques macroscòpiques: Les colònies presenten un aspecte compacte, amb una textura que recorda a la del cotó fluix. Inicialment són de color blanc, passant per coloracions grises o negres al madurar els conidis, al ser incubades sobre PDA durant 7-13 dies a 25°C. El revers és de color negre.

Característiques microscòpiques: Els conidiòfors són hialins, a la zona intermèdia són amples i en el punt de formació dels conidis són prims.

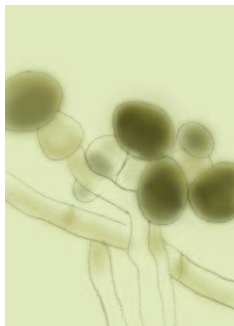


Figura 3.16. *Nigrospora*. Dibuix del fong observat al microscopi.



12.-***Paecilomyces***. Característiques macroscòpiques: Les colònies creixen ràpidament en el medi de cultiu PDA o bé AEM i maduren en 3 dies. Poden créixer bé a temperatures altes, 50°C. Les colònies tenen una textura, polsegosa o envellutada. El color és inicialment blanc, i arriba a ser groc, de color verd groc, groc - marró, rosat o violeta, depenent de l'espècie.

Característiques microscòpiques: Els conidis formen llargues cadenes divergents, són unicel·lulars i hialins, la seva mida pot variar inclús dins de la mateixa espècie. Generalment, originen clamidòspores de parets llises i de color marró.



Figura 3.17. *Paecilomyces*. Dibuix del fong observat al microscopi.

13.-***Periconia***. Característiques macroscòpiques: colònies de color fosc, verd o marró, de textura vellutada. Revers de les colònies de color molt fosc, al ser incubades en AEM durant 7 dies a 27°C.

Característiques microscòpiques: conidis foscos, esfèrics o el·lipsoïdals, verrucosos, en cadenes curtes formant clústers, a partir de conidiòfors rectes, que es ramifiquen només a la part de dalt



Figura 3.18. *Periconia*. Dibuix del fong observat al microscopi.

## PART EXPERIMENTAL I DISCUSSIÓ DE RESULTATS

La Taula 3.2. conté la informació sobre els fongs identificats a cada una de les mostres analitzades.

<b>Gènere</b>	<b>Mostres</b>	<b>Gènere</b>	<b>Mostres</b>
<b><i>Acremonium</i></b>	M1mes B final túnel B 15 dies B 2 mesos B final CC 1 C C 2 RSU 1 RSU 2 CCB	<b><i>Absidia</i></b>	M inici M 2 mesos B inici
<b><i>Aspergillus</i></b>	M inici M meitat túnel M final túnel M 2 mesos M final B inici B final túnel B final CC 1 C C 2	<b><i>Cladosporium</i></b>	M 2 mesos CC 1
<b><i>Fusarium</i></b>	M inici  CC 1	<b><i>Geotrichum</i></b>	M inici  B inici
<b><i>Mucor</i></b>	M inici  M15 dies  M 2 mesos B inici B 2 mesos B final RSU 1 RSU 2 C C 2	<b><i>Nigrospora</i></b>	CC 1
<b><i>Paecilomyces</i></b>	CC 1	<b><i>Penicillium</i></b>	M inici M 2 mesos M final B inici CC 1
<b><i>Periconia</i></b>	M final	<b><i>Rhizopus</i></b>	M inici M final túnel M15 dies M final
<b><i>Trichoderma</i></b>	M inici M 2 mesos B inici B 1 mes CC 1 C C 2		

Taula 3.2. Relació dels gèneres de fongs aïllats de cada una de les mostres analitzades.  
(M: Manresa, B: Blanes, RSU: Residu Sòlid Urbà, Casolà; compost casolà i CC: compost cavall).

Prenent les dades de la taula anterior, s'observa que les mostres de Manresa, Minici i M3Mesos, presenten més varietat de gèneres de fongs que les seves homòlogues de Blanes. De totes elles, la que en presenta més varietat és el compost final casolà i la que en presenta menys és el compost procedent de fems de cavall que, també, és en el qual s'hi van desenvolupar menys colònies.

Les mostres de Blanes presenten bàsicament quatre gèneres de fongs, molt comuns a l'ambient, que són: *Mucor*, *Acremonium*, *Aspergillus* i *Trichoderma*.

Els gèneres *Trichoderma*, *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Absidia* i *Geotrichum* es troben en les dues mostres, Minici i Binici; són gèneres molt comuns en sòls. La mostra Minici conté a més els gèneres *Fusarium* i *Rhizopus* que també habiten als sòls.

*Trichoderma*, *Mucor* i *Aspergillus* es troben en ambdues mostres de compost Casolà, A la mostra C1 s'han trobat els gèneres *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium* i *Nigrospora*. Aquests gèneres de fongs no són presents a la mostra C2, on s'hi detecta el gènere *Mucor* absent a la mostra C1. Tots els fongs que s'han trobat en aquestes mostres són molt comuns en sòls, menys els gèneres *Cladosporium* i *Nigrospora* que es troben fonamentalment en matèria vegetal en descomposició.

Les mostres RSU1 i RSU2 presenten els mateixos gèneres de fongs, l'*Acremonium* i el *Mucor*. El compost procedent de fems de cavall només presenta un gènere de fong, l'*Acremonium*.

El gènere *Acremonium* es troba present en totes les mostres de compost final menys a la de Manresa, l'*Aspergillus* es troba en totes les mostres menys en les de RSU i CC. El *Mucor* s'aïlla de totes les mostres menys a la de M3mesos, C1 i CC. El gènere *Trichoderma* a dues de les 7 mostres dels diferents composts finals, C1 i C2. El gènere *Penicillium* a dues de les 7 mostres, M3mesos i C1.

Tots els fongs aïllats pertanyen a gèneres comuns en mostres ambientals de Catalunya.

### 3.5. Detecció de soques potencialment micotoxigèniques d'*Aspergillus* i de *Penicillium*.

A la present Tesi s'han aïllat vint soques identificades com a espècies d'*Aspergillus* i *Penicillium*. La Taula 3.3. aporta informació sobre els fongs aïllats de cada una de les mostres analitzades de les plantes de Blanes i Manresa.

La Taula 3.4 mostra la informació dels fongs aïllats de les dues mostres de compost casolà en el seu estadi final de producció.

A partir de les mostres de residu sòlid urbà i compost de cavall no s'han aïllats fongs dels gèneres *Aspergillus* i *Penicillium*.

Manresa (M)	Gènere	Blanes(B)	Gènere
<b>M inici</b>	<i>Penicillium</i>	<b>B inici</b>	1 soca de <i>Penicillium</i>
	3 soques d' <i>Aspergillus</i>		<i>Aspergillus</i>
<b>M meitat túnel</b>	2 soques d' <i>Aspergillus</i>	-----	
<b>M final túnel</b>	3 soques d' <i>Aspergillus</i>	<b>B final túnel</b>	1 soca d' <i>Aspergillus</i>
<b>M 15 dies</b>	-----	<b>B 15 dies</b>	-----
<b>M1 mes</b>	-----	<b>B 1 mes</b>	-----
<b>M 2 mesos</b>	2 soques d' <i>Aspergillus</i>	<b>B 2 mesos</b>	-----
<b>M 3mesos</b>	1 soca d' <i>Aspergillus</i>	<b>B 3 mesos</b>	1 soca d' <i>Aspergillus</i>
	1 soca de <i>Penicillium</i>		

Taula 3.3. Relació de fongs potencialment micotoxigènics trobats a cada una de les mostres analitzades de les depuradores de Blanes i Manresa.

Mostra (C)	Gènere
<b>C casolà 1</b>	1 soca d' <i>Aspergillus</i>
	1 soca de <i>Penicillium</i>
<b>C casolà 2</b>	1 soca d' <i>Aspergillus</i>

Taula 3.4. Relació de fongs potencialment micotoxigènics trobats en les mostres analitzades de compost casolà.

### 3.5.1. Mètode de la Food and Drug Administration per a la detecció de soques productores de toxines.

El mètode recomanat per la Food and Drug Administration (FDA, 1998) per a la determinació de la producció de toxines per part de fongs, consisteix en fer desenvolupar la soca fúngica en estudi sobre arròs i posteriorment es realitza una extracció de les toxines amb cloroform. En el present treball, es substitueix el cloroform per una barreja de metanol:aigua.

En l'etapa posterior de detecció de les toxines, es recomana aplicar un dels mètodes descrits a la bibliografia per Samson *et al.* (1992), Stack (1996) o per l'AOAC (2003), que utilitzen cromatografia de capa fina o cromatografia HPLC. En el nostre estudi, però, s'utilitza un mètode de HPLC-DAD-MS (Ventura *et al.*, 2004).

#### a) Inòcul de sembra.

L'inòcul de sembra es prepara dins d'una cabina de flux laminar vertical. L'inòcul consisteix en dos disquets de cultiu de 6 mm de diàmetre, obtinguts amb una pipeta pasteur estèril, perforant una colònia del fong a provar, cultivat sobre agar extracte de malta al 2% durant 7 dies a 27°C. Els dos disquets de cultiu, es dipositen dins d'un erlenmeyer de 100 ml que conté arròs, tal i com es descriu a continuació: Dins un erlenmeyer de 100 ml es pesen 5 g d'arròs, se li addicionen 5 ml d'aigua desionitzada i s'autoclava a 121°C durant 15 min. L'arròs s'inocula, com s'ha dit anteriorment, amb 2 disquets de cultiu. Per cada mostra, es sembren 3 erlenmeyers que s'incuben a 27°C durant 7, 14 i 21 dies. A la Figura 3.19 es mostra l'aspecte d'una colònia d'*Aspergillus niger* d'on se n'han extret dos disquets de cultiu per a fer la sembra de l'arròs. La Figura 3.20, presenta una mostra d'arròs recent inoculada amb els dos disquets de cultiu. A la Figura 3.21, es mostra la mateixa mostra d'arròs després de 7 dies d'incubació a 27°C.

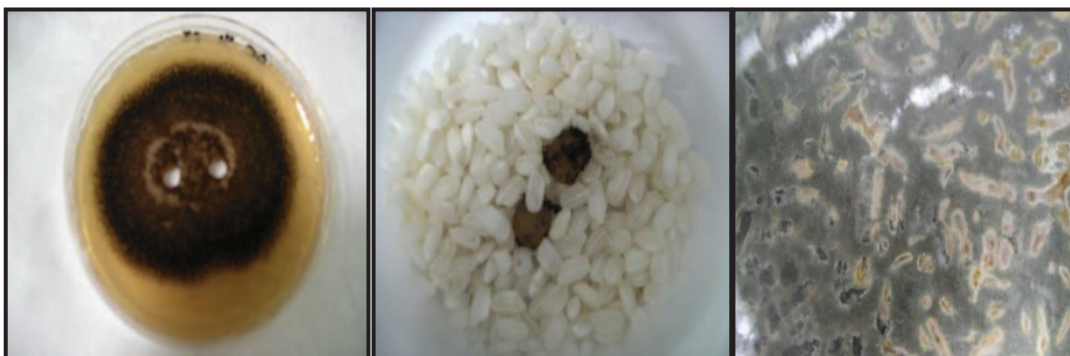


Figura 3.19.

Figura 3.20.

Figura 3.21.

Figura 3.19. Presentació d'un cultiu d'*Aspergillus niger* d'on se n'han extret dos disquets de cultiu. Figura 3.20. Mostra d'arròs amb els dos disquets de cultiu abans de ser incubada. Figura 3.21. Aspecte de la mostra d'arròs inoculada als 7 dies d'incubació a 27°C.

Després del període d'incubació (7, 14 o 21 dies a 27°C), es realitza el procediment per a l'extracció de les toxines. Per fer-ho, se segueix el mètode de la FDA (1998) havent substituït el cloroform com a solvent d'extracció de les toxines, com es descriu a l'apartat 3.5.2. Després es determinarà la producció de les aflatoxines i Ocratoxina A mitjançant dos mètodes: el primer desenvolupat per HPLC-DAD-MS (Ventura *et al.*, 2004) i el segon desenvolupat per UHPLC-UV (Navajas *et al.*, 2010). Quan es vol comprovar la capacitat micotoxigènica dels fongs aïllats de les diferents mostres de compost, s'utilitza el mètode HPLC-DAD-MS. Quan es realitzen diferents anàlisis amb les mostres de control, s'utilitza el mètode desenvolupat per UHPLC-UV

### **3.5.2. Solvent d'extracció de les aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> i Ocratoxina A en arròs.**

Com s'ha comentat a l'apartat anterior, el mètode proposat per la FDA (1998) empra cloroform com a solvent d'extracció. Una alternativa a la utilització d'aquest solvent és la mescla metanol:aigua descrita per Trucksess *et al.* (1999) per a l'anàlisi d'OTA, molt menys contaminant que el cloroform. Per a millorar la ionització de les toxines quan aquestes s'injecten en el sistema HPLC-MS s'afegeix un 0,1% d'àcid fòrmic a la fase mòbil tal i com es descriu a l'apartat 3.5.4 d'aquesta Tesi.

El mètode utilitzat per a realitzar l'extracció sobre la matriu d'arròs és el següent:

Sobre el total de la mostra d'arròs es realitzen dues extraccions successives amb 45 ml de la mescla del solvent d'extracció, deixant-ho 30 minuts en agitació magnètica, i posteriorment, es filtra amb paper de filtre Whatman número 3 per gravetat. El filtrat es recull en un matràs aforat de 100 ml, s'enrasa amb una mescla del solvent d'extracció de la mateixa proporció; després s'agafen 5 ml de l'extracte i se li afegeixen 6,5 ml d'aigua amb 0,1% d'àcid fòrmic, per tal de tenir un contingut del 40% en metanol, que coincideix amb la composició inicial del gradient cromatogràfic. Per acabar, es filtra amb un filtre de niló de 0.22 µm

Finalment, s'injecta al sistema cromatogràfic en les condicions que es descriuran a l'apartat 3.5.4 del present treball.

### 3.5.3. Solvent d'extracció de les aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> i ocratoxina A en compost.

L'objectiu d'aquest apartat és comprovar diferents solvents i diferents metodiques per a l'extracció de les aflatoxines i l'OTA que es puguin haver format sobre compost. Aquesta comprovació es realitza per a poder constatar la producció de toxines, tant per part de les soques de control *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 i *Aspergillus ochraceus* CECT 2948 com per part dels fongs aïllats en les diferents mostres de composts finals de Blanes i Manresa analitzades. Per a realitzar-ho, es vol utilitzar una metodica que permeti l'extracció simultània de les aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> i OTA.

Cal tenir en compte que fins a l'actualitat, el nombre d'articles publicats per a mètodes simultanis per a l'anàlisi d'aflatoxines i d'OTA és reduït (Dunne *et al.* 1993) (Jonsyn *et al.* 1995) (Scudamore *et al.* 1997) (Scudamore *et al.* 1998) (Göbel *et al.* 2004) (Ventura *et al.* 2004) (Navajas *et al.*, 2010).

A la present Tesi, com a solvent d'extracció s'utilitza una barreja de metanol:aigua (Navajas *et al.*, 2010), ja que s'ha comprovat el seu bon funcionament pels diferents tipus de mostres en estudi. A l'apartat 3.5.3.1, es descriu el mètode utilitzat.

### 3.5.3.1. Variació del mètode de la FDA.

La composició química de l'arròs i del compost són molt diferents, és per aquest motiu que el solvent d'extracció del mètode pensat per a arròs s'ha de modificar lleugerament en la proporció dels dissolvents d'extracció.

Per exemple, cal considerar que l'arròs conté un 0,4% de compostos lipídics, en canvi el compost en conté valors entre el 30 i el 40%. Es decideix doncs, disminuir la proporció de metanol, utilitzant una mescla de solvent d'extracció del 70 % en MeOH i 30 % d'H<sub>2</sub>O (Navajas *et al.*, 2010). La metodologia que s'ha seguit és detalla a continuació:

Dins un erlenmeyer de 100 ml es pesen 5 g de compost, se li addicionen 5 ml d'aigua desionitzada i s'autoclava a 121°C durant 15 min. El compost s'inocula, com s'ha dit anteriorment amb 2 disquets de cultiu. Transcorregut el temps d'incubació es realitzen dues extraccions successives amb 45 ml de la mescla del solvent d'extracció Metanol:Aigua (70:30), deixant-ho 30 minuts en agitació magnètica, i posteriorment, es filtra per gravetat. El filtrat es recull en un matràs aforat de 100 ml, s'enrasa amb una mescla de solvent d'extracció de la mateixa proporció; després s'agafen 6,5 ml de l'extracte i se li afegixen 5 ml d'aigua 0,1 % àcid fòrmic, per tal de tenir un contingut del 40% en metanol. Per acabar, es filtra amb un filtre de niló de 0.22 µm.

### 3.5.4. Condicions cromatogràfiques per a la detecció d'aflatoxines i ocratoxina A.

En aquest apartat es descriu com s'ha realitzat la determinació cromatogràfica simultània de les aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> i OTA. S'escull la fase mòbil que permeti compatibilitzar la separació cromatogràfica utilitzant dos mètodes: el primer (1) utilitzant HPLC-DAD-MS i el segon (2) utilitzant un equip d'UHPLC-UV.

Com s'ha dit, el nombre d'articles publicats sobre l'anàlisi simultània de les aflatoxines i l'OTA és reduït. El mètode proposat per Göbel i Lusky (2004) usa com a fase mòbil una mescla de metanol: acetonitril: aigua (1% àcid fòrmic) i el publicat per Tuomi *et al.*, (2001) utilitza una mescla de metanol: acetat amònic aquós (10 mM). Navajas *et al.*, (2010) utilitza una barreja metanol:aigua.



En el present estudi, s'utilitza per al mètode (1) (Detector MS) una mescla de metanol i aigua amb un 0,1% d'àcid fòrmic, aquest mètode és una adaptació del publicat per Ventura *et al.* 2004 per a l'anàlisi de les toxines presents en plantes medicinals. L'àcid fòrmic proporciona bona detecció de les toxines perquè és volàtil i facilita la ionització dels analits. Per al mètode (2) (Detector DAD) s'empra una mescla de metanol aigua sense àcid fòrmic ja que no es necessari afavorir la ionització. A continuació es presenten els dos mètodes utilitzats.

#### 3.5.4.1 Mètode HPLC-DAD-MS (1).

Les condicions cromatogràfiques utilitzades es resumeixen a continuació:

- Equip: WatersAlliance 2690 + ZMD
- Columna: : WatersXTerraMSC18 (2.1x100mm, 3.5  $\mu$ m)
- Temperatura columna: 30°C
- Volum injecció: 10  $\mu$ L
- Flux: 0,2mL/min
- Fase mòbil: A:CH<sub>3</sub>OH  
B: H<sub>2</sub>O (0.1% HCOOH)

El gradient utilitzat és el que mostra a continuació a la Taula 3.5:

Temps/min	%A : CH <sub>3</sub> OH	%B:H <sub>2</sub> O(1%HCOOH)
0	40	60
6	85	15
9	85	15
10	40	60
16	40	60

Taula 3.5. Gradient utilitzat en el cromatògraf HPLC.

Detector/s: Detector 1: Amb el detector DAD s'ha treballat entre 200-400nm per enregistrar tot l'espectre, però la d'interès és de 350nm. Detector 2: S'ha injectat en mode SIR en el detector de masses seguint els ions que es detallen a la Taula 3.7.

Els temps de retenció de les toxines són els que es mostren en la Taula 3.6.

Toxina	Tr (min)
AFG <sub>2</sub>	4.21
AFG <sub>1</sub>	5.24
AFB <sub>2</sub>	6.35
AFB <sub>1</sub>	7.09
OTA	10.82

Taula 3.6. Temps de retenció de les toxines.

### **Espectrometria de masses:**

El sistema d'HPLC-DAD s'acobla a un espectròmetre de masses de quadrupol simple amb ionització per electrosprai (WatersZMD). Les condicions de treball són les recomanades en el manual de l'instrument (WatersZMD) quan es treballa a un flux de 0,2 ml/min.

### **Paràmetres del Tune:**

- Voltatge del capil·lar: 3 kV (mode positiu), 2,5 kV (mode negatiu).
- Voltatge d'extracció: 7 V
- Voltatge de con: de 5 a 120 V
- Lents de radio freqüència: 0,5 V
- Temperatura de la font: 100°C
- Temperatura de dessolvatació: 350°C

### **Paràmetres de l'espectròmetre de masses:**

- Energia del ió: 0,5 V
- Resolució a masses altes: 12,5
- Resolució a masses baixes: 12,5
- Flux de gas de dessolvatació: 500 l/h
- Flux de gas de con: 30 l/h
- Fotomultiplicador: 650

## PART EXPERIMENTAL I DISCUSSIÓ DE RESULTATS

La detecció es realitza en mode SIR: ESI positiu de 0 a 9,5 minuts on es detectaran les aflatoxines G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, B<sub>2</sub> i ESI negatiu de 9,5 a 14 minuts per a la detecció de l'ocratoxina A. El cromatograma, d'un patró d'aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> i OTA d'una concentració de 0,4mg/L, amb detector DAD i en mode SIR+ i SIR- és el que es mostra a la Figura 3.22.

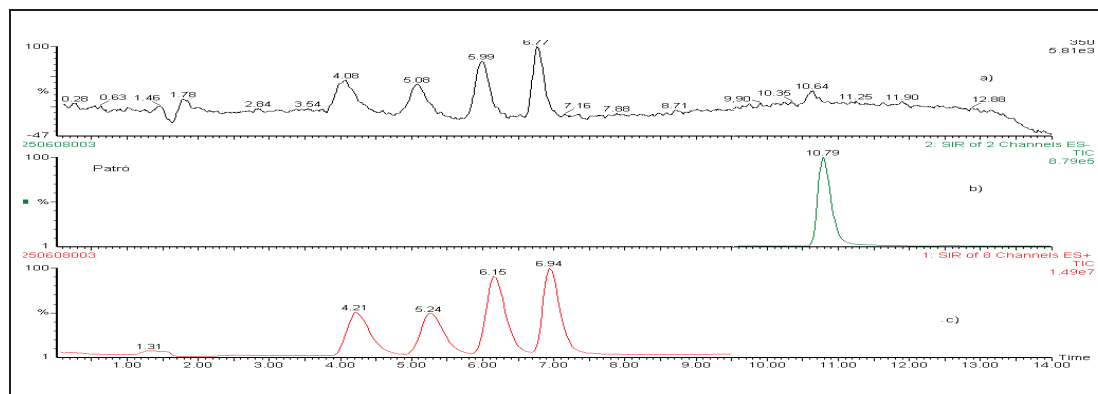


Figura 3.22. Cromatograma d'un patró d'aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> i OTA d'una concentració de 0,4mg/L de cadascuna de les toxines. El cromatograma (a), realitzat en detector DAD a 350nm. (b) realitzat en mode SIR+, (c) en mode SIR-.

Les masses dels ions que es segueixen en cada toxina són les que es descriuen a la Taula 3.7. on el ió primari correspon a la massa de la molècula protonada en el cas de ESI positiu i desprotonada en el cas de ESI negatiu i el ió secundari és l'adducte amb sodi per a les quatre aflatoxines i per l'ocratoxina A és una fragmentació de la molècula.

Toxina	ESI	ió primari (m/z)	Voltatge de con ió primari (V)	ió secundari (m/z)	Voltatge de con ió secundari (V)	tr (min)
AFB <sub>1</sub>	Positiu	313.1	20	335.0	40	7.09
AFG <sub>1</sub>	Positiu	329.1	20	351.0	40	5.24
AFB <sub>2</sub>	Positiu	315.1	40	337.0	40	6.35
AFG <sub>2</sub>	Positiu	331.0	40	353.0	40	4.21
OTA	Negatiu	402.3	20	358.1	40	10.82

Taula 3.7. Ions primaris i secundaris (m/z) de cada toxina, voltatges de con (V) i temps de retenció (tr) per a cada toxina.

Les relacions de massa/càrrega dels pics seguits en mode SIR positiu del patró de les toxines G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, i B<sub>1</sub> de 0,4mg/L de concentració en dissolució es mostren a la Figura 3.23.

Les determinacions per a cada toxina s'han efectuat al voltatge de con que es mostra a la Taula 3.7.

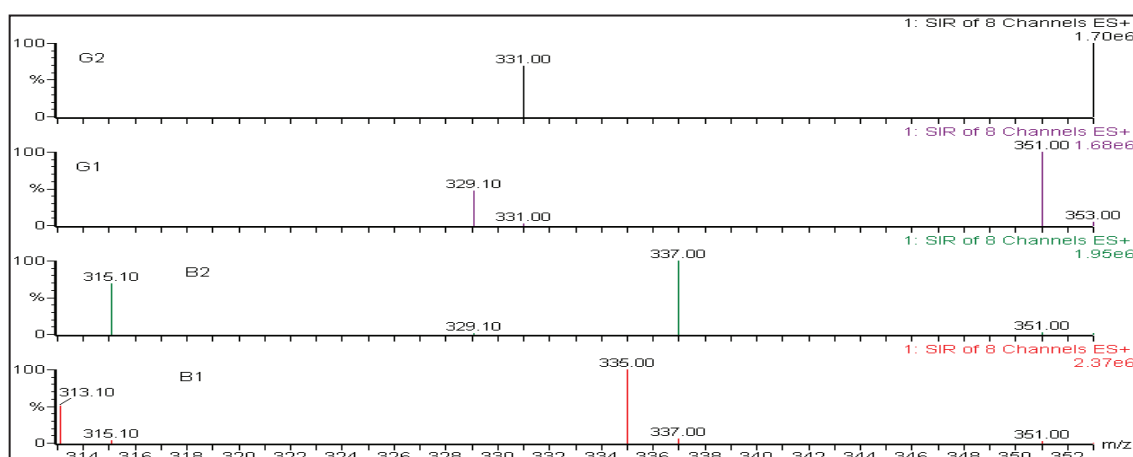


Figura 3.23. Relació massa/càrrega dels ions que es segueixen per cada una de les toxines G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, i B<sub>1</sub> en mode Sir positiu.

A continuació es mostra la relació massa/càrrega dels ions en mode SIR negatiu d'un patró de la toxina OTA de 0,4 mg/L en dissolució a la Figura 3.24.

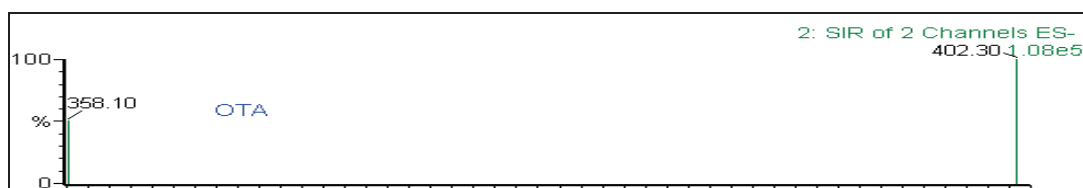


Figura 3.24. Relació massa/càrrega dels ions que es segueixen per la toxina OTA en mode Sir negatiu.

### 3.5.4.2 Mètode UHPLC- UV (2).

El mètode utilitzat per a realitzar les anàlisis en UHPLC-UV va ser posat a punt pel nostre grup de treball. El substrat de creixement del fong era una matriu alimentària, concretament sobre anacards (Alfaro *et al.*, 2013).

Les condicions cromatogràfiques utilitzades es resumeixen a continuació:

- Columna: Acquity (2,1x50mmx1,7 $\mu$ m)
- Flux: 0,4mL/min
- Fase mòbil: A: CH<sub>3</sub>OH B:H<sub>2</sub>O, a la Taula 3.8. es mostra el gradient de fase mòbil utilitzat.

t/min	A%	B%
0	40	60
2,3	85	15
2,5	85	15
2,6	40	60
3,2	40	60

Taula 3.8. Gradient de fase mòbil utilitzat

- Detector/s: UV Acquityultraperformance LC  
Detector 1: Detector de UV. La longitud d'ona de treball és  $\lambda=350\text{nm}$ .

El cromatograma d'un patró de 0,4mg/L de la barreja de les quatre aflatoxines i l'OTA, amb detector DAD a una  $\lambda=350$  nm és el que es mostra a la Figura 3.25.

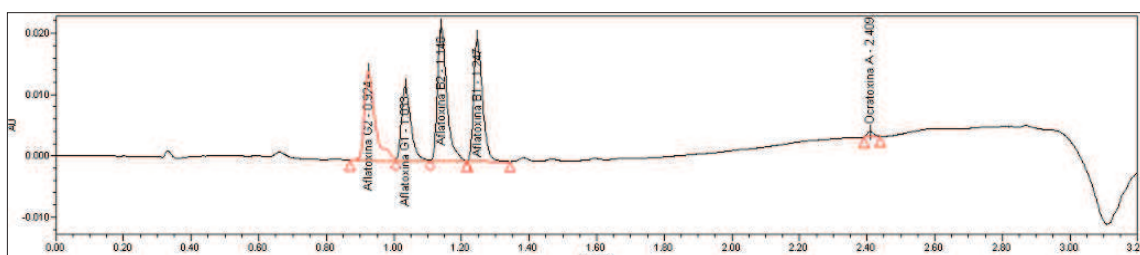


Figura 3.25. Cromatograma d'una dissolució de 0,4mg/L dels analits d'interès obtingut amb el detector de UV a una  $\lambda=350$ nm

### 3.5.4.3. Límit de detecció (LD) i límit de quantificació (LQ) pels detectors DAD, MS i UV.

El límit de quantificació és la mínima quantitat d'analit que el sistema és capaç de determinar en el marge de treball. Es calcula com la quantitat de substància que equival a un pic d'alçada igual a deu vegades l'alçada del soroll.

El límit de detecció es defineix com la mínima quantitat d'analit que el sistema és capaç de detectar, és a dir, que proporciona una senyal diferenciable del soroll.

Es calcula com la quantitat de substància que equival a un pic d'alçada igual a tres vegades l'alçada del soroll.

Per determinar el (LD) i el (LQ) del detector UV, de les dissolucions patrons s'ha utilitzat una dissolució de 20µg/L per a les aflatoxines i una dissolució de 0,4mg/L per a l'ocratoxina A. La Taula 3.9. es mostren els LD.

Tècnica	LD(µg/L) AflatoxinaG <sub>2</sub>	LD(µg/L) AflatoxinaG <sub>1</sub>	LD(µg/L) AflatoxinaB <sub>2</sub>	LD(µg/L) AflatoxinaB <sub>1</sub>	LD(µg/L) OTA
<b>HPLC-MS</b>	10	10	10	10	1
<b>HPLC-DAD</b>	100	100	100	100	200
<b>UHPLC-UV</b>	0,6	0,7	0,4	0,4	10

La Taula 3.9. Límit de detecció per a cada una de les toxines estudiades segons el detector.

A la Taula 3.10. es mostren els Límits de quantificació (LQ).

Tècnica	LQ(µg/L) AflatoxinaG <sub>2</sub>	LQ(µg/L) AflatoxinaG <sub>1</sub>	LQ(µg/L) AflatoxinaB <sub>2</sub>	LQ(µg/L) AflatoxinaB <sub>1</sub>	LQ(µg/L) OTA
<b>HPLC-MS</b>	32	32	32	32	3,5
<b>HPLC-DAD</b>	150	150	150	150	220
<b>UHPLC-UV</b>	2	2,4	1,5	1,5	36

Taula 3.10. Límit de quantificació per a cada una de les toxines estudiades segons el detector.

En aquest últim apartat es pot apreciar la diferència dels límits de detecció entre el DAD, l'espectròmetre de masses de simple quadrupol i el detector UV.

Per a les aflatoxines l'espectròmetre de masses resulta ser molt més sensible que el detector DAD ja que es pot injectar en mode SIR i es segueixen els ions característics de cada toxina. És amb el detector UV però quan s'arriba als límits de detecció i quantificació més baixos.

En canvi, en el cas de l'ocratoxina A, el detector de MS resulta millor que el detector UV. El detector UV de longitud d'ona variable permet arribar a límits inferiors que el detector DAD. Aquest fet s'explica perquè en el mètode s'utilitza un UHPLC on s'obtenen pics més estrets que amb l'HPLC. Aquests valors coincideixen amb els obtinguts per Navajas (2008).



#### 3.5.4.4. Comparació dels dos mètodes cromatogràfics : HPLC-DAD (1) i UHPLC- UV (2).

Per a realitzar la comparació dels dos mètodes d'HPLC-MS-DAD (1) i UHPLC- UV (2), es consideren els següents paràmetres: temps de retenció i consum de fase mòbil. Les dades es presenten a la Taula 3.11.

Mètode	tr (min)	Consum de f.m (mL/cromatograma)
(1)	18	3,6
(2)	3,2	1,3

Taula 3.11. Relació del temps de retenció, consum de fase mòbil per a cada un dels mètodes (1) i (2)

Com s'observa a la Taula 3.11, el temps de retenció del mètode (1) és 5,5 vegades superior al del mètode (2). El consum de fase mòbil per injecció en el mètode (1) és 3 vegades superior al del mètode (2).

### 3.5.5. Càlcul de la recuperació d'aflatoxines adicionades sobre arròs i sobre compost per HPLC-DAD.

Com s'ha esmentat anteriorment, l'anàlisi d'aflatoxines és molt comú en mostres d'aliments, però no ho és sobre altres matrius com per exemple el compost. És per aquest motiu que es vol comprovar si l'extracció de les toxines sobre compost es realitza de manera correcta. Així doncs, calcular les recuperacions de cada una de les toxines és l'objectiu d'aquest apartat.

S'han realitzat les anàlisis, per a calcular les recuperacions, sobre mostres de compost i d'arròs a les que s'hi ha addicionat una quantitat coneguda de les aflatoxines G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>.

Per tal d'estudiar les recuperacions s'ha realitzat l'addició que es descriu a continuació:

**Addició:** S'afegeixen a 5g de compost 10µg de cadascuna de les toxines d'interès i es realitza l'extracció segons l'apartat 3.5.2, aquesta addició correspon a una concentració en mostra de 2mg/kg. En les mostres de 5g d'arròs s'afegeixen 2 µg de cadascuna de les aflatoxines i l'extracció és realitza segons l'apartat 3.5.3 per a les mostres de compost de Blanes i Manresa, aquesta addició correspon a una concentració en mostra de 0,4mg/kg. L'addició de les toxines es realitza a partir d'una dissolució mare de 100mg/L, i s'addicionen a la matriu abans d'afegir la mescla MeOH:H<sub>2</sub>O corresponent. En totes les anàlisis, que es descriuran posteriorment, les condicions de l'HPLC són les descrites a l'apartat 3.5.4.3. S'utilitza el mètode HPLC-DAD.

L'estudi s'ha realitzat sobre 3 mostres de compost i 3 mostres d'arròs. Seguidament, a la Taula 3.12. es mostra la mitjana de les recuperacions obtingudes per a cada aflatoxina segons la matriu estudiada.

Els resultats obtinguts s'han calculat respecte a un patró injectat amb el detector DAD.

Matriu	Pes mostra	µg toxina adicionada	mg/kg en mostra	Recup(%) AFG <sub>2</sub>	Recup(%) AFG <sub>1</sub>	Recup(%) AFB <sub>2</sub>	Recup(%) AFB <sub>1</sub>
Arròs	5g	2	0,4mg/kg	93	106	80	116
Compost	5g	10	2mg/kg	66	77	51	84

Taula 3.12. Recuperacions obtingudes per a cada un de les aflatoxines adicionades sobre arròs i sobre compost. Resultats obtinguts amb el detector DAD.

A la Taula 3.13. es mostren els coeficients de variació per  $n=3$ .

<b>Matriu</b>	<b>CV G<sub>2</sub></b>	<b>CV G<sub>1</sub></b>	<b>CV B<sub>2</sub></b>	<b>CV B<sub>1</sub></b>
<b>Arròs</b>	1,0%	0,3%	2,6%	3,5%
<b>Compost</b>	4,4%	4,6%	2,8%	7,8%

Taula 3.13. Resultats dels coeficients de variació pera cada una de les aflatoxines.

Com es veu a la Taula 3.12, les recuperacions per a cada una de les toxines són més altes en arròs que en compost. El compromís entre l'augment del grau de polaritat del solvent d'extracció i l'estructura química apolar de les toxines, explica que la recuperació sigui més baixa en compost que en arròs. Aquest mateix raonament és pot aplicar al fet que les recuperacions de les toxines G<sub>1</sub> i B<sub>1</sub> siguin més altes que les de les toxines G<sub>2</sub> i B<sub>2</sub>, ja que el primer grup són més polars i en ambdues matrius s'extreuen millor.

Cal tenir en consideració que la matriu del compost és més complexa i conté més elements apolars que la de l'arròs. Per aquest motiu el solvent amb el qual es realitza l'extracció en compost, és més polar que en el cas de l'arròs, d'aquesta manera s'evita extreure components apolars del compost que podrien interferir en les anàlisis.

Els coeficients de variació (CV%) que es mostren a la Taula 3.13 es troben entre l'1% - 3,5 % si la matriu és arròs i entre el 4,4%-7,8% si la matriu és compost. Els CV% són més alts quan la matriu és compost.

**3.6. Comprovació de la producció d'aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> i ocratoxina A a partir de les soques *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 i *Aspergillus ochraceus* CECT 2948 sobre arròs i sobre compost.**

Com s'ha dit a la introducció, en primer lloc es vol comprovar si, tal i com està descrit, la soca de control *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 produeix les aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub> i si la soca *Aspergillus ochraceus* CECT 2948 produeix l'OTA quan es desenvolupen sobre arròs. El resultat es mostra a l'apartat 3.6.1, mitjançant l'aplicació dels mètode cromatogràfic (1) descrit a l'apartat 3.5.4.1 En segon lloc, a l'apartat 3.6.2 es procedeix a estudiar si les mateixes soques procedents de la CECT també poden produir les aflatoxines al desenvolupar-se sobre compost.

### 3.6.1. Comprovació de la producció d'aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> i ocratoxina A en arròs a partir de les soques *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 i *Aspergillus ochraceus* CECT 2948 per HPLC-DAD-MS.

Com s'ha comentat, en aquest treball el vol comprovar la capacitat micotoxigènica dels fongs aïllats dels diferents composts estudiats al desenvolupar-se sobre arròs, ja que és el substrat recomanat per la FDA. L'anàlisi cromatogràfica es realitzarà seguint el mètode (1) descrit a l'apartat 3.5.4.1, per HPLC-MS.

Per tal comprovar que els mètodes de cultiu i de detecció de les toxines son adequats, primer de tot es realitza tot l'experiment utilitzant les soques *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 i *Aspergillus ochraceus* CECT 2948. Com s'ha dit, està plenament demostrada la seva capacitat per produir aflatoxines i Ocratoxina A, respectivament, quan creixen sobre arròs. Comprovar que efectivament son micotoxigèniques, ens demostrarà que el mètode utilitzat en aquest treball és útil per a detectar quines soques aïllades en aquest treball poden ser productores d'aflatoxines i/o d'OTA.

Les soques de control es trobaven conservades en tubs de PDA (Potato- Dextrose- Agar), a 4°C. Per a recuperar-les, s'ha efectuat una sembra d'aquestes, del tub a una placa de petri que conté el mateix medi de cultiu. Es comprova en ambdós casos per microscòpia òptica que el fongs desenvolupats són els correctes i no s'hi troba contaminació de cap altre tipus de fong.

A la Figura 3.26. es mostra una fotografia de la soca d'*Aspergillus parasiticus* desenvolupada en PDA (27°C, 7 dies) i a la Figura 3.27 una fotografia d'una preparació observada al microscopi òptic.

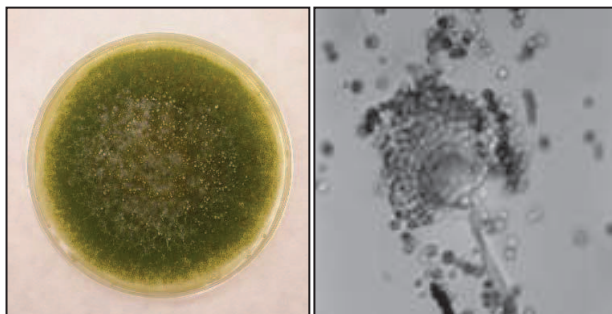


Figura 3.26. *Aspergillus parasiticus* (PDA, 27°C, 7 dies incubació). Figura 3.27. Fotografia de l'*Aspergillus parasiticus* al microscopi òptic.

A la Figura 3.28. es mostra una fotografia de la soca d'*Aspergillus ochraceus* desenvolupada en PDA (27°C, 14 dies) i a la Figura 3.29 una fotografia d'una preparació al microscopi òptic.

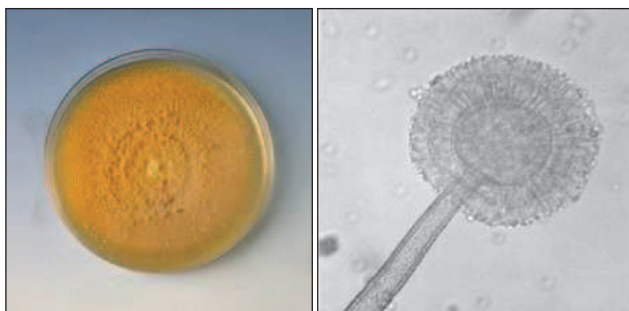


Figura 3.28 .*Aspergillus ochraceus* (PDA, 27°C, 14 dies incubació). Figura 3.29. Fotografia de l'*Aspergillus ochraceus* al microscopi òptic.

Per a l'estudi de la producció d'OTA es treballa amb la soca *Aspergillus ochraceus* CECT 2948 i s'ha seguit el mateix procediment que per a l'estudi de la producció d'aflatoxines per part de *Aspergillus parasiticus* CECT 2681.

El mètode utilitzat per comprovar la producció de toxines per part de les soques de control és el següent:

Dins un erlenmeyer de 100 ml es pesen 5 g d'arròs, se li addicionen 5 ml d'aigua desionitzada i s'autoclava a 121°C durant 15 min. L'arròs s'inocula amb 2 disquets de cultiu per cada mostra i s'incuba a 27°C durant 7, 14 i 21 dies.

Després de les incubacions, es procedeix a realitzar el procés d'extracció de les toxines (aflatoxines o OTA) seguint el procediment descrit a l'apartat 3.5.2.

Com es pot comprovar a les Figures 3.30 i 3.31, es pot afirmar que l'*Aspergillus ochraceus* CECT 2948 produeix OTA al ser incubat durant 7,14,21 dies en arròs a 27°C.

A la Figura 3.30. s'aporta el resultat de la injecció en mode SIR negatiu d'un patró de concentració 0,4 mg/L per a la seva comprovació.

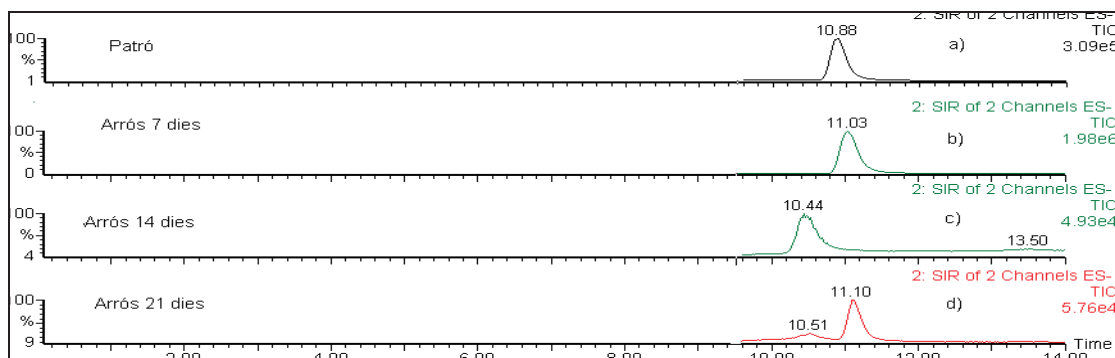


Figura 3.30. (a) cromatograma en mode Sir negatiu d'un patró de Ocratoxina A de concentració 0,4 mg/L, (b),(c),(d) cromatograma en mode Sir negatiu de l'extracte del cultiu sobre arròs als 7, 14 i 21 dies d' incubació de la soca de control.

El resultat de comparar la relació de ions de la Figura 3.30 amb el d'un patró d'OTA es presenta a la Figura 3.31. En la relació de ions del patró d'OTA es pot observar que els més abundants són el 402,3, que correspon al ió primari (M-1) i el 358,1 que és el ió secundari. Així doncs es corrobora que, efectivament, la soca de control *Aspergillus ochraceus* CECT 2948 es capaç de produir la OTA als 7, 14 i 21 dies d'incubació sobre arròs ja que els temps de retenció coincideixen amb els del patró i la relació de ions de cada tant en l'ió primari com en el secundari amb els del patró.

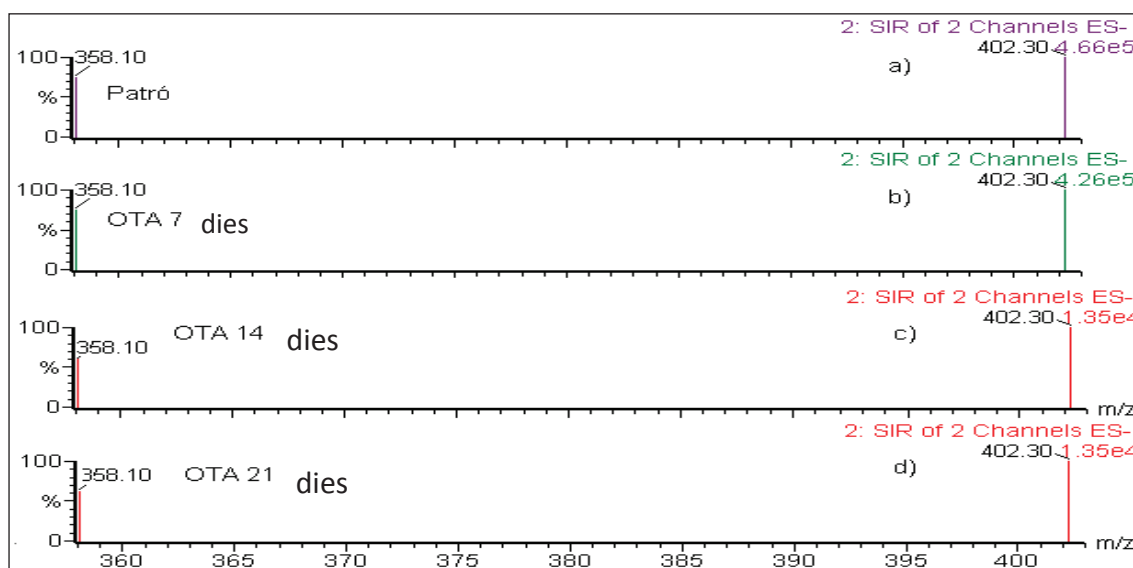
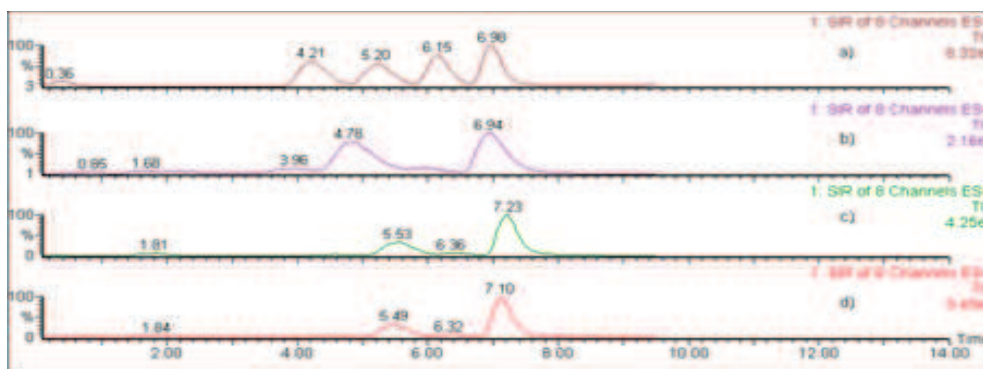


Figura 3.31. (a) relació de ions d'un patró de Ocratoxina A de concentració 0,4 mg/L (b) relació de ions de la mostra de 7 dies d' incubació de la soca de control (c) relació de ions de la mostra de 14 dies d'incubació de la soca de control (d) relació de ions de la mostra de 21 dies d'incubació de la soca de control.

En el cas de la soca de control *Aspergillus parasiticus* CECT 2681, es comprova la seva capacitat de produir les aflatoxines G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>1</sub>. A les Figures 3.32 i 3.33 es presenten els resultats.

La Figura 3.32, correspon al cromatograma en mode SIR positiu de l'extracte del cultiu de la soca *Aspergillus parasiticus* CECT 2681, després de ser incubada durant 7, 14 i 21 dies en arròs a 27°C i el d'un patró de concentració de 0,4mg/L de les quatre aflatoxines.



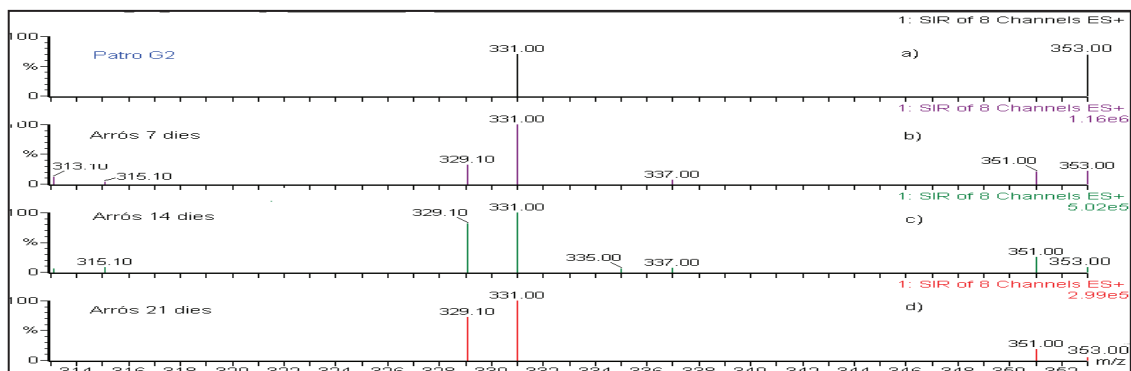
La Figura 3.32. Correspon al cromatograma en mode SIR positiu de l'avaluació de la soca *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 (a) cromatograma del patró de concentració 0,4mg/L (b) cromatograma als 7 dies d'incubació (c) cromatograma als 14 dies d'incubació (d) cromatograma als 21 dies d'incubació.

A continuació es mostren els resultats de la comprovació de la identificació de les toxines a partir de la relació de l'abundància dels ions dels pics obtinguts al cromatograma de la Figura 3.32.

Es comprova pel mateix procediment la capacitat que té la soca *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 de produir les aflatoxines.



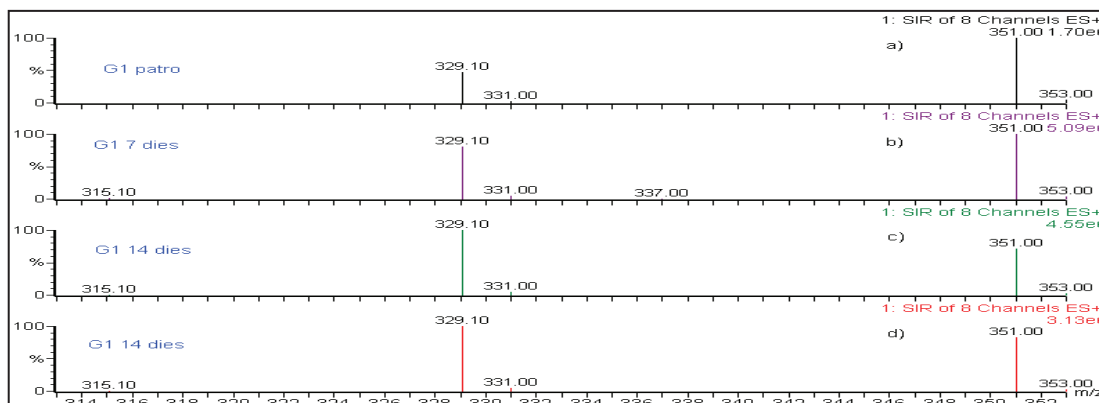
A la Figura 3.33 es compara la relació de ions d'un patró de 0,4 mg/L de la toxina  $G_2$  amb la relació de ions del primer pic de la Figura 3.32 que es podria assimilar per temps de retenció a la toxina  $G_2$ . El pic és el de l'arròs 7 dies, amb un temps de retenció de 3.96 minuts.



La Figura 3.33. Relació de ions en mode SIR positiu de l'avaluació de la soca *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 (a) relació de ions del patró de 0,4 mg/L de la toxina  $G_2$  (b) relació de ions de l'extracte del cultiu als 7 dies d'incubació (c) relació de ions de l'extracte del cultiu als 14 dies d'incubació (d) relació de ions de l'extracte del cultiu als 21 dies d'incubació.

En la relació de ions del patró de l'aflatoxina  $G_2$  es pot observar que els ions més abundants són el 331, que correspon al ió primari ( $M+1$ ) i el 353 que és el ió secundari corresponen a l'adducte amb sodi. S'observa que el ió secundari corresponent a la relació  $m/Z$  de 353 és més abundant en el patró que en les mostres. També s'observa que les mostres contenen un ió que correspon a una relació  $m/Z$  de 329.10, que el patró no té. Aquest fet pot ser degut a la presència d'una substància interferent en la mostra que incrementa la relació entre ions.

A la Figura 3.34. es compara la relació dels ions d'un patró de 0,4 mg/L de la toxina  $G_1$  amb la relació de ions del segon pic de la Figura 3.32 que es podria assimilar per temps de retenció a la toxina  $G_1$ . En el cas del de l'arròs 7, 14 i 21 dies, responen als temps de retenció de 4.78, 5.53 i 5.49 respectivament.



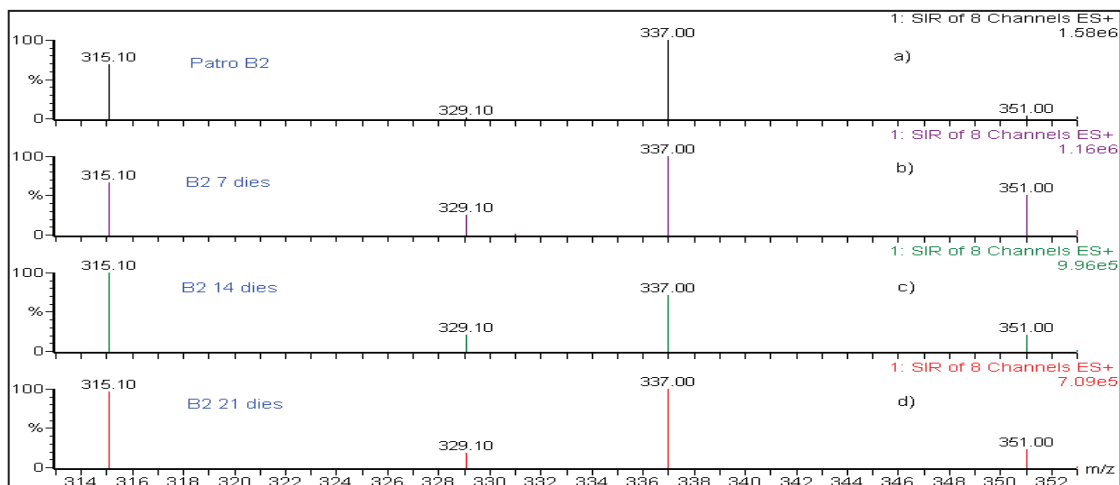
La Figura 3.34. Relació de ions en mode SIR positiu de l'avaluació de la soca *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 (a) relació de ions del patró de 0,4 mg/L de la toxina  $G_1$  (b) relació de ions de l'extracte del cultiu als 7 dies d'incubació (c) relació de ions de l'extracte del cultiu als 14 dies d'incubació (d) relació de ions als 21 dies d'incubació

En la relació de ions del patró de l'aflatoxina  $G_1$  es pot observar que els ions més abundants són el 329,1 ja que correspon al ió primari ( $M+1$ ) i el 351 que és el ió secundari corresponen a l'adducte amb sodi.

Cal destacar que l'abundància relativa dels ions seguits, difereix lleugerament entre patró i mostres. S'observa que l'ió que correspon a una relació  $m/Z$  de 329.1 és en general més abundant a les mostres que en el patró.

Aquesta abundància augmenta en detriment de l'ió que correspon a una relació  $m/Z$  de 351.0. Aquest últim és més abundant en el patró que en les mostres. Aquest fet pot ser degut, com en el cas de la toxina  $G_2$  a la presència d'una substància interferent en la mostra que presenta els mateixos ions que seguim.

A la Figura 3.335. es compara la relació dels ions d'un patró de 0,4 mg/L de la toxina B<sub>2</sub> amb la relació de ions del tercer pic de la Figura 3.302, aquest es podria assimilar per temps de retenció a la toxina B<sub>2</sub>. En el cas de l'arròs 7, 14 i 21 dies, responen als temps de retenció de 6.36 i 6.32 respectivament.

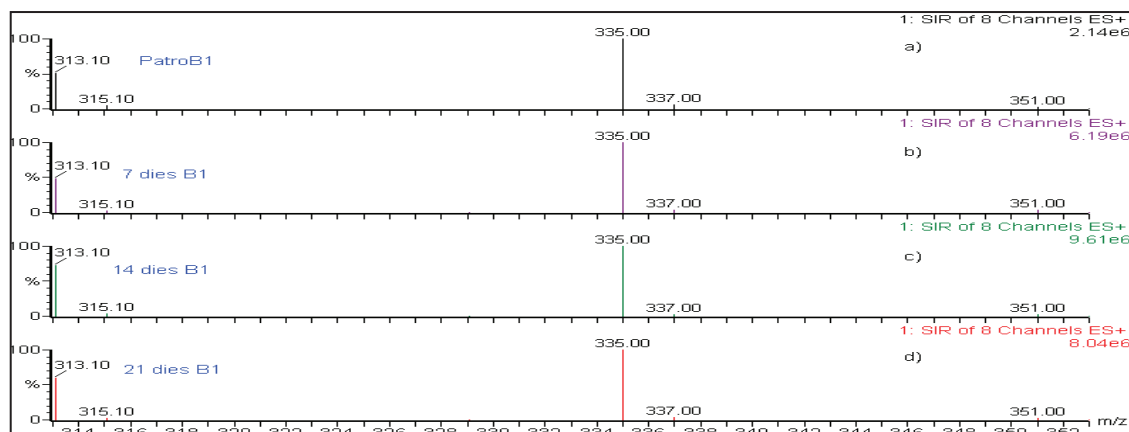


La Figura 3.35. Relació de ions en mode SIR positiu de l'avaluació de la soca *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 (a) relació de ions del patró de 0,4 mg/L de la toxina B<sub>2</sub> (b) relació de ions de l'extracte del cultiu als 7 dies d'incubació (c) relació de ions de l'extracte del cultiu als 14 dies d'incubació (d) relació de ions de l'extracte del cultiu als 21 dies d'incubació.

En la relació dels ions que correspon al patró de l'aflatoxina B<sub>2</sub> es pot observar que els ions més abundants són el 315,1 ja que correspon al ió primari (M+1) i el 337 que és el ió secundari corresponen a l'adducte amb sodi.

La relació entre els ions del patró i els de les mostres, difereix lleugerament com en el cas de les altres toxines.

Per acabar amb aquest apartat, la Figura 3.36. compara la relació de ions d'un patró de 0,4 mg/L de la toxina B<sub>1</sub> amb l'espectre de masses del quart pic de la Figura 3.32 aquest es podria assimilar per temps de retenció a la toxina B<sub>1</sub>. En el cas de l'extracte del cultiu sobre arròs incubat durant 7, 14 i 21 dies, responen als temps de retenció de 6.36 i 6.32 respectivament.



La Figura 3.36. Correspon a la relació dels ions en mode SIR positiu de l'avaluació de la soca *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 (a) relació de ions del patró de 0,4 mg/L de la toxina B<sub>1</sub> (b) relació de ions de l'extracte del cultiu als 7 dies d'incubació (c) relació de ions de l'extracte del cultiu als 14 dies d'incubació (d) relació de ions de l'extracte del cultiu als 21 dies d'incubació

En la relació dels ions de l'aflatoxina B<sub>1</sub> es pot observar que els ions més abundants són el 313,1 ja que correspon al ió primari (M+1) i el 335 que és el ió secundari corresponen a l'adducte amb sodi.

En el cas de l'aflatoxina B<sub>1</sub> cal destacar que la relació entre ions es manté pràcticament igual entre el patró i les diferents mostres.

A continuació a la Taula 3.14. i la Taula 3.15. es resumeix la informació anterior. A la primera Taula es mostra l'abundància relativa de l'ió principal i de l'ió secundari de cada un dels patrons de les toxines estudiades, juntament amb els de les toxines produïdes per les soques de control de la CECT. A la segona Taula es presenta el resultat de dividir l'abundància relativa de l'ió secundari per la de l'ió primari per 7, 14 i 21 dies.

Es realitza aquest càlcul per tal d'identificar i determinar si pot haver-hi solapament amb altres substàncies que poguessin interferir amb les toxines que s'estudien.

Es comprova que la relació de ions en mode SIR positiu per les quatre aflatoxines i en mode SIR negatiu per a l'ocratoxina A, corresponguin amb el dels seus patrons.

## PART EXPERIMENTAL I DISCUSSIÓ DE RESULTATS

Els càlculs s'han realitzat tenint en compte els ions primaris i secundaris indicats a la Taula 3.7.

	G <sub>2</sub>		G <sub>1</sub>		B <sub>2</sub>		B <sub>1</sub>		OTA	
	% ió primari	ió secundari	% ió primari	ió secundari	% ió primari	ió secundari	% ió primari	ió secundari	% ió primari	ió secundari
<b>Patró</b>	70	100	50	100	70	100	50	100	100	70
<b>7 dies</b>	100	20	80	100	70	100	50	100	100	80
<b>14</b>	100	10	100	70	100	70	70	100	100	60
<b>21</b>	100	10	100	80	100	100	60	100	100	60

Taula 3.14. Abundància dels ions primaris i secundaris pel patró de cada toxina i pels de la toxina produïda per les soques de control als 7, 14 i 21 dies d'incubació sobre arròs.

% (ió secundari/ió primari)	G <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	OTA
<b>Patró</b>	143	200	143	200	70
<b>7 dies</b>	20	125	143	200	80
<b>14 dies</b>	10	70	70	143	60
<b>21 dies</b>	10	80	100	167	60

Taula 3.15. Càlcul de la relació entre l'ió secundari i primari del patró de cada una de toxines estudiades i per les toxines produïdes per les soques de control en tant per cent.

Com s'observa en ambdues taules, l'abundància dels ions primaris i secundaris de les mostres, difereixen de les del patró amb que es comparen. La relació expressada a la Taula 3.14, mostra que en algunes toxines la relació dels ions amb els del patró es manté constant (B<sub>1</sub>, OTA). La Taula 3.15. mostra la relació en tant per cent de l'ió primari respecte el secundari tampoc no és la mateixa entre les toxines produïdes per les soques de control i les del patró. Aquest fet es pot atribuir a un efecte matriu que afectaria la ionització.

La tendència per a les toxines G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i OTA és que augmenti l'abundància en el ió primari i disminueixi en el secundari. El contrari que en les toxines B<sub>2</sub> i B<sub>1</sub>, on passa justament al revés, augmenta el ió secundari en relació al primari. Aquest fet reafirma la idea que les soques de control produeixen les toxines d'interès però que també existeixen altres substàncies que presenten els mateixos ions secundaris i primaris. Aquestes poden ser metabòlits o bé productes de reaccions entre diferents compostos del fong o bé la matriu.

### 3.6.2. Estudi comparatiu de la quantificació per espectrometria de masses de la producció de toxines en funció del seguiment dels ions primaris i secundaris per part de les soques de control *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 i *Aspergillus ochraceus* CECT 2948.

En aquest apartat es realitza la quantificació de la producció de toxines després d'incubar les soques *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 i *Aspergillus ochraceus* CECT 2948, productores d'aflatoxines i OTA respectivament, sobre arròs durant 7, 14 i 21 dies a 27°C. El valor presentat a les Taules 3.16 i 3.17 és el resultat de realitzar per a cada toxina l'extracció dels seus dos ions més característics per separat (veure Taula 3.6). En el cas de les aflatoxines, es segueixen els ions que tenen una relació  $m/z$  que correspon al pes molecular de la toxina protonada, així com el corresponent adducte en sodi. Les aflatoxines es detecten en mode SIR positiu. En el cas de l'OTA, també s'estudien dos ions característics, un correspon a la relació  $m/z$  de la molècula desprotonada i l'altre correspon a una fragmentació de la toxina. Les condicions de l'anàlisi cromatogràfica són les que s'han presentat a l'apartat 3.7.

Les condicions d'incubació, el solvent d'extracció i el mètode cromatogràfic usat són els que es presenten als següents apartats: 3.5.1, 3.5.2 i 3.5.4.2

Temps d'incubació	G2(mg/Kg)		G1(mg/Kg)		B2(mg/Kg)		B1(mg/Kg)	
	m/z 331,2	353	m/z 329,1	351	m/z 315,2	337	m/z 313,1	335
7 dies	14	1	155	124	14	26	122	225
14 dies	7	1	111	38	12	6	125	87
21 dies	5	0	75	30	8	5	87	72

Taula 3.16. Concentració d' aflatoxines produïdes sobre arròs després de realitzar l'extracció per separat dels ions primari i secundari de cada toxina.

OTA(mg/Kg)	
m/z 402,3	m/z 358
91	143
2	3
2	3

Taula 3.17. Concentració d'OTA produïda sobre arròs després de realitzar l'extracció per separat dels ions primari i secundari de la toxina.

Independentment dels ions triats per a la quantificació, es pot observar que, en general la quantitat de toxina produïda es molt alta i disminueix a mesura que augmenten els dies d'incubació, essent, l'OTA la que presenta la major davallada de producció.

També es pot observar en totes les toxines que la quantificació en mostra per cada una d'elles varia segons si s'ha considerat el ió primari o bé el secundari i no dona el mateix valor. Això indica que hi ha un efecte matriu en les mostres ja que el seu comportament és diferent al del patró. Aquest fet es podria, previsiblement millorar amb la utilització d'un espectròmetre de masses de triple quadrupol ja que la selectivitat i l'exactitud del mètode es veurien millorades.

Pot contribuir a l'efecte matriu el fet que l'ió secundari de les aflatoxines és el de l'adducte en sodi, espècie que no ha estat introduïda voluntàriament ni a la mostra ni a la fase mòbil. Els valors porten a pensar que els resultats obtinguts per les aflatoxines, a partir del mètode cromatogràfic usat, són més fiables pel ió que correspon a la relació  $m/z$  de la molècula protonada que els obtinguts pel ió que correspon a l'adducte en sodi. En el cas de l'OTA, ambdós resultats obtinguts són comparables ja que no es forma cap adducte sinó una fragmentació.

Donada la variació dels resultats, ens vàrem plantejar repetir l'anàlisi utilitzant com a detector un DAD. En aquest cas, l'experiència es va realitzar, fent incubacions de cada fong sobre arròs durant 7 dies a 27°C. L'anàlisi cromatogràfica es realitza mitjançant HPLC-DAD. Els resultats que es presenten a la Taula 3.18, són la comparació de la quantificació de cada una de les toxines utilitzant el detector DAD i el detector de masses pel ió secundari o bé el primari.

Detector	G2(mg/Kg)	G1(mg/Kg)	B2(mg/Kg)	B1(mg/Kg)	OTA(mg/Kg)
MS (ió primari)	14	155	14	122	91
MS (ió secundari)	1	124	26	225	143
DAD	7	91	14	303	No detectable

Taula 3.18. Valors de la quantificació de cada una de les toxines utilitzant el detector de MS per l'ió primari, ió secundari i el detector DAD.

Es pot comprovar que utilitzant els dos detectors, MS i DAD, els valors de producció de les aflatoxines són del mateix ordre de magnitud menys en el cas de l'aflatoxina B<sub>1</sub> que dona un valor superior utilitzant HPLC-DAD. En el cas de l'ocratoxina, utilitzant el detector DAD, no es pot detectar.

### 3.6.3. Avaluació de la capacitat de producció d'aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> i ocratoxina A en compost final de Blanes i Manresa per part de les soques *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 i *Aspergillus ochraceus* CECT 2948 per HPLC-DAD-MS.

Un cop s'ha comprovat que les dues soques de col·lecció *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 i *Aspergillus ochraceus* CECT 2948, produeixen les aflatoxines i l'OTA sobre arròs, es vol comprovar la capacitat d'aquestes soques de produir les toxines d'interès en compost final de Blanes i Manresa.

Per a cada mostra de compost final es realitza el mateix procediment que per l'arròs:

Dins un erlenmeyer de 100 ml es pesen 5 g de compost, se li addicionen 5 ml d'aigua desionitzada i s'autoclava a 121°C durant 15 min. El compost s'inocula amb 2 disquets de cultiu del fong procedent de la CECT, per a cada mostra i s'incuba a 27°C durant 7, 14 i 21 dies. Abans de la sembra es comprova la identitat del fong per microscòpia òptica que els fongs desenvolupats siguin els correctes i que no s'hi troben contaminacions de cap altre fong. És realitza l'extracció tal i com es descriu a l'apartat 3.5.3. L'extracte s'injecta al cromatògraf seguint el mètode HPLC-DAD-MS descrit a l'apartat 3.5.4.1. El resultat de la inoculació de les soques de control sobre compost mostra que aquestes creixen correctament com es pot observar a la pàgina 130 d'aquesta Tesi.

Cal remarcar que la producció de toxines es considera positiva quan els pics apareixen al mateix valor de tems de retenció que el patró, tant amb el detector DAD com en mode SIR+ o bé SIR- en el detector de MS.

A continuació, els cromatogrames que es presenten són els de les mostres de Blanes i Manresa. Han estat inoculades per separat amb dos disquets de cultiu de les dues soques de control de la CECT utilitzades en aquest estudi.



A les Figures 3.37 a 3.42 es mostren els cromatogrames obtinguts amb el detector DAD i amb SIR positiu per les mostres de compost inoculades amb la soca de control *Aspergillus parasiticus*, i els cromatogrames en mode SIR negatiu que corresponen a la soca *Aspergillus ochraceus*.

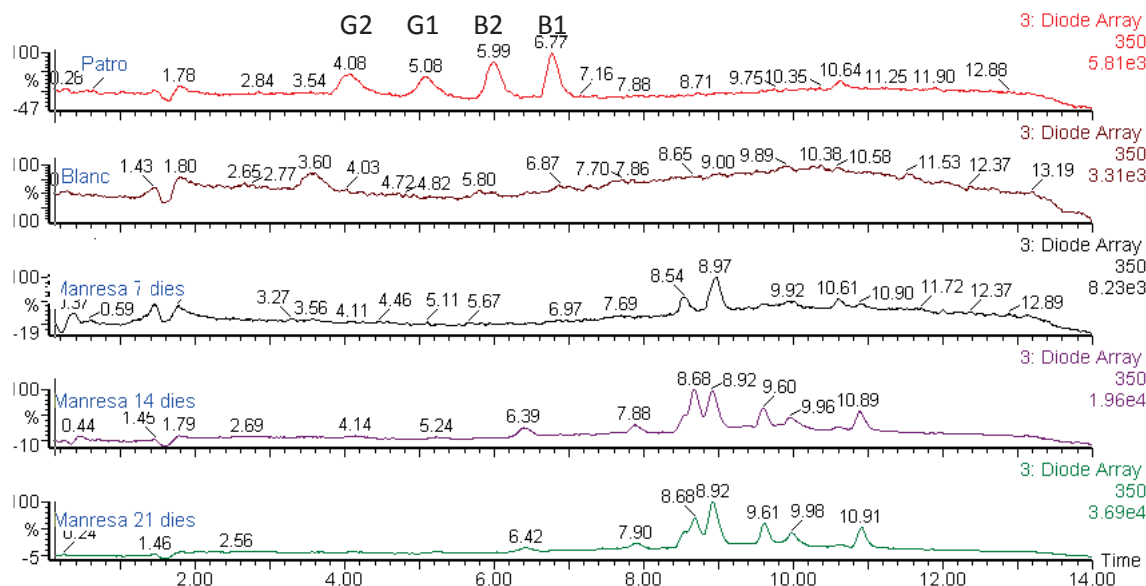


Figura 3.37. Cromatograma de l'extracte del cultiu en detector DAD de la soca *Aspergillus parasiticus* incubada sobre compost de Manresa (a) cromatograma del patró de concentració 0,4mg/L (b) cromatograma de l'extracte del cultiu incubat durant 7 dies, sense inocular amb soca fúngica (c) cromatograma de la mostra incubada 7 dies amb dos disquets de cultiu (d) cromatograma de l'extracte del cultiu incubat durant 14 dies amb dos disquets de cultiu (e) cromatograma de l'extracte del cultiu incubat durant 21 dies amb dos disquets de cultiu.

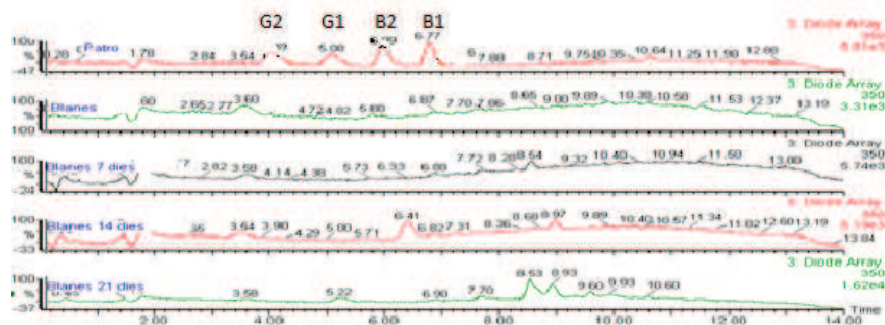


Figura 3.38. Cromatograma de l'extracte del cultiu en detector DAD de la soca *Aspergillus parasiticus* incubada sobre compost de Blanes (a) cromatograma del patró de concentració 0,4mg/L (b) cromatograma de l'extracte del cultiu incubat durant 7 dies, sense inocular amb soca fúngica (c) cromatograma de l'extracte del cultiu incubat 7 dies amb dos disquets de cultiu (d) cromatograma de l'extracte del cultiu incubat durant 14 dies amb dos disquets de cultiu (e) cromatograma de l'extracte del cultiu incubat durant 21 dies amb dos disquets de cultiu.

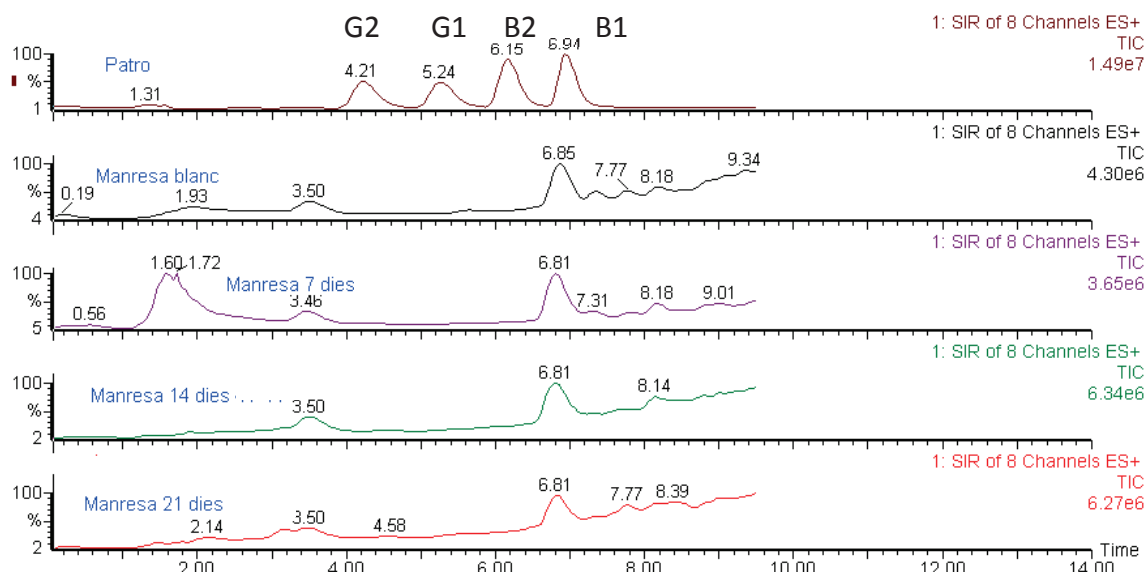


Figura 3.39. Cromatograma de l'extracte del cultiu en mode SIR positiu de la soca *Aspergillus parasiticus* incubada sobre compost de Manresa (a) cromatograma del patró de concentració 0,4mg/L (b) cromatograma de l'extracte del cultiu incubat durant 7 dies, sense inocular amb soca fúngica (c) cromatograma de l'extracte del cultiu incubat 7 dies amb dos disquets de cultiu (d) cromatograma de l'extracte del cultiu incubat durant 14 dies amb dos disquets de cultiu (e) cromatograma de l'extracte del cultiu incubat durant 21 dies amb dos disquets de cultiu.

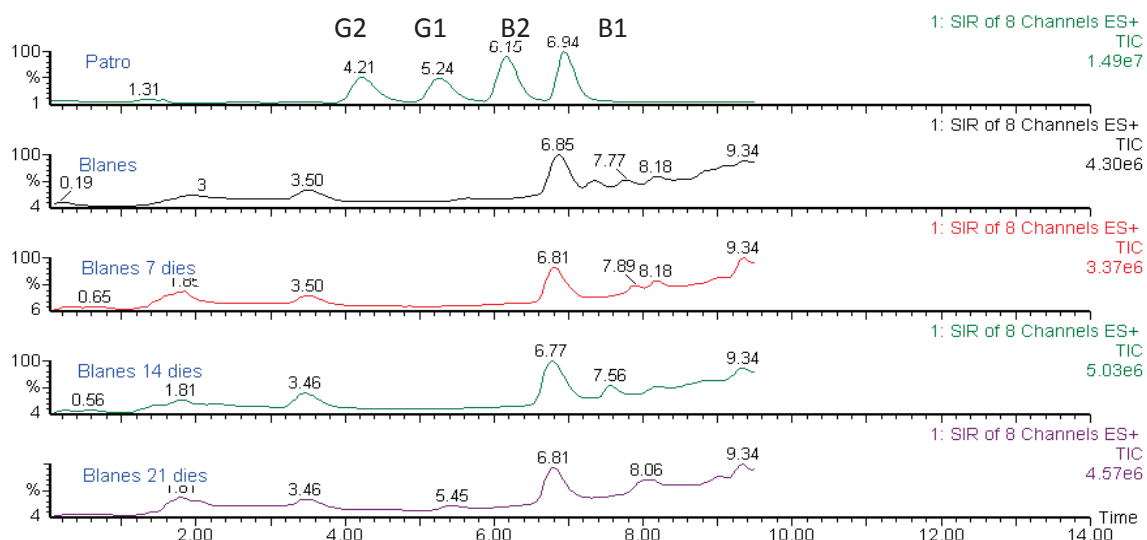


Figura 3.40. Cromatograma de l'extracte del cultiu en mode SIR positiu de la soca *Aspergillus parasiticus* incubada sobre compost de Blanes (a) cromatograma del patró de concentració 0,4mg/L (b) cromatograma de l'extracte del cultiu incubat durant 7 dies, sense inocular amb soca fúngica (c) cromatograma de l'extracte del cultiu incubat 7 dies amb dos disquets de cultiu (d) cromatograma de l'extracte del cultiu incubat durant 14 dies amb dos disquets de cultiu (e) cromatograma de l'extracte del cultiu incubat durant 21 dies amb dos disquets de cultiu.

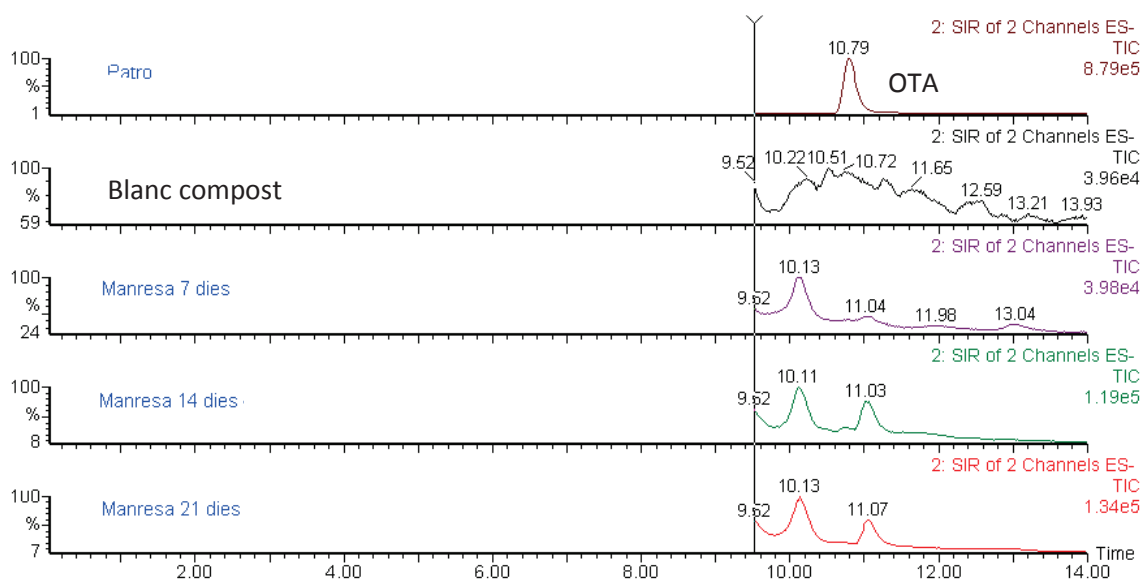


Figura 3.41. Cromatograma de l'extracte del cultiu en mode SIR positiu de la soca *Aspergillus ochraceus* incubada sobre compost de Manresa (a) cromatograma del patró de concentració 0,4mg/L (b) cromatograma de l'extracte del cultiu de la mostra de compost de Manresa incubat durant 7 dies, sense inocular amb soca fúngica (c) cromatograma de l'extracte del cultiu incubat 7 dies amb dos disquets de cultiu (d) cromatograma de l'extracte del cultiu incubat durant 14 dies amb dos disquets de cultiu (e) cromatograma de l'extracte del cultiu incubat durant 21 dies amb dos disquets de cultiu.

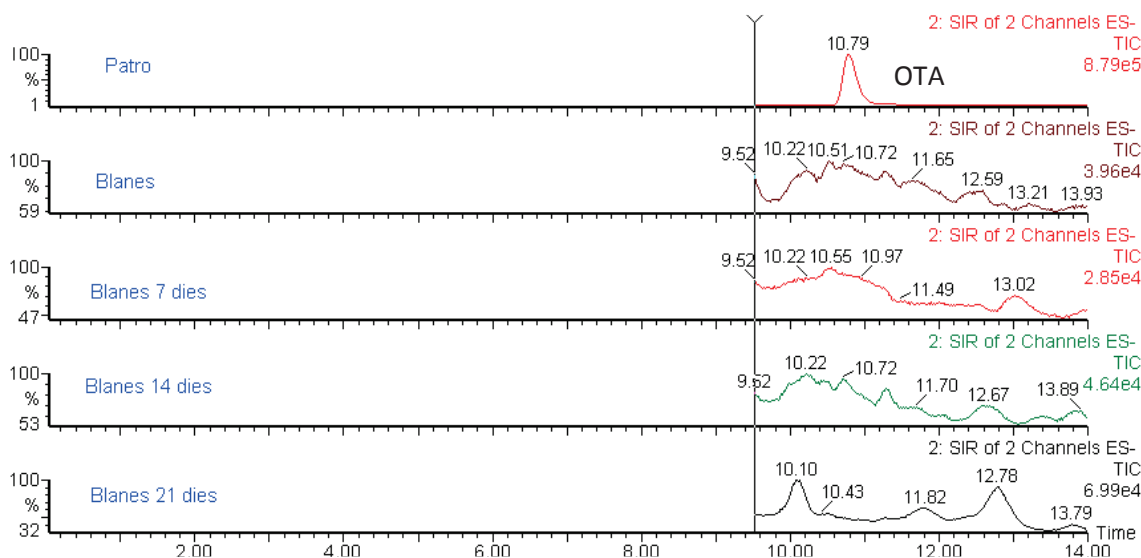


Figura 3.42. Cromatograma de l'extracte del cultiu en mode SIR positiu de la soca *Aspergillus ochraceus* incubada sobre compost de Blanes (a) cromatograma del patró de concentració 0,4mg/L (b) cromatograma de l'extracte del cultiu de la mostra de compost de Blanes incubat durant 7 dies, sense inocular amb soca fúngica (c) cromatograma de l'extracte del cultiu incubat 7 dies amb dos disquets de cultiu (d) cromatograma de l'extracte del cultiu incubat durant 14 dies amb dos disquets de cultiu (e) cromatograma de l'extracte del cultiu incubat durant 21 dies amb dos disquets de cultiu.

Com es pot observar a les Figures 3.37. i 3.38, que corresponen als cromatogrames obtinguts amb el detector DAD, de les soques de control incubades sobre compost de Manresa i Blanes, no s'hi s'observa cap pic atribuïble a la formació de toxines. A les Figures 3.39, 3.40, 3.41 i 3.42, que corresponen als cromatogrames obtinguts en SIR+ i SIR-, si que s'observen pics als tr de les toxines. Com s'ha dit a l'inici de l'apartat, es considera producció de toxines positiva, si el tr del pic estudiat, coincideix amb el patró i apareix alhora en el detector DAD i en mode Sir+ o Sir-. Per tant, la producció d'aflatoxines és inferior a 0,5 mg/kg en mostra i la producció d'OTA és inferior a 0,05 mg/kg en mostra.

Tot i així, es realitza una injecció en mode SCAN d'aquestes mostres, que correspon a la sembra dels fongs sobre compost final (Figura 3.43). També és realitza una injecció en mode SCAN del patró de concentració 0,4mg/L de cada una de les toxines (Figura 3.44.).

A partir del cromatograma de la Figura 3.43, en injecció mode SCAN, es podria pensar que hi ha producció d'aflatoxina B<sub>1</sub> a tr 6.80, pel que es fa necessari estudiar l'espectre de masses per poder treure una conclusió final.

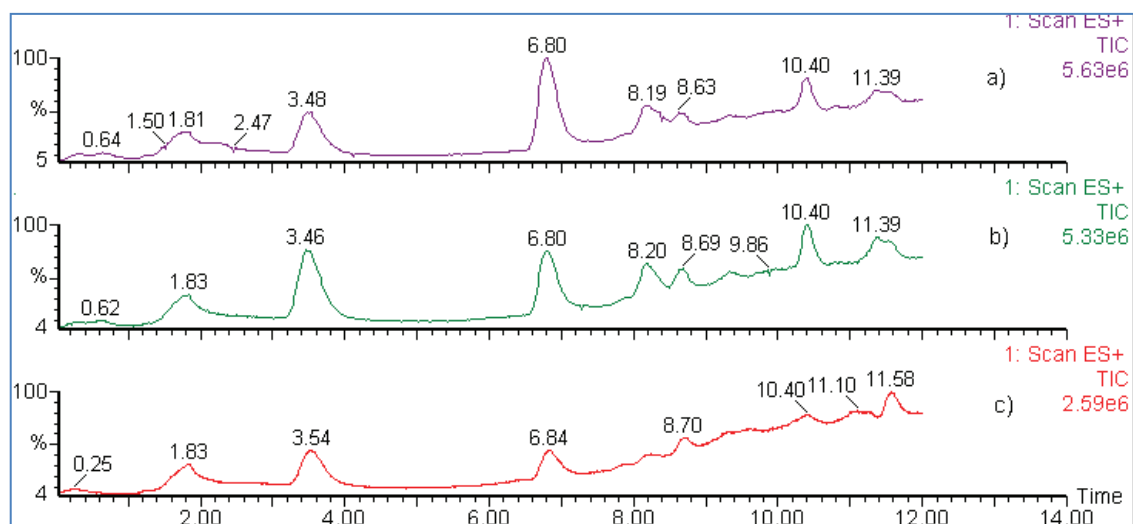


Figura 3.43. Cromatograma amb mode SCAN de l'extracte del cultiu d'una mostra de compost de Blanes després de 7 dies d'incubació amb la soca de control *Aspergillus parasiticus*. El cromatograma (a) realitzat a voltatge 20v (b) realitzat a voltatge 40 v (c) realitzat a voltatge 60v.

A la Figura 3.44, es mostra l'espectre de masses del patró de la toxina B<sub>1</sub> a diferent voltatges.

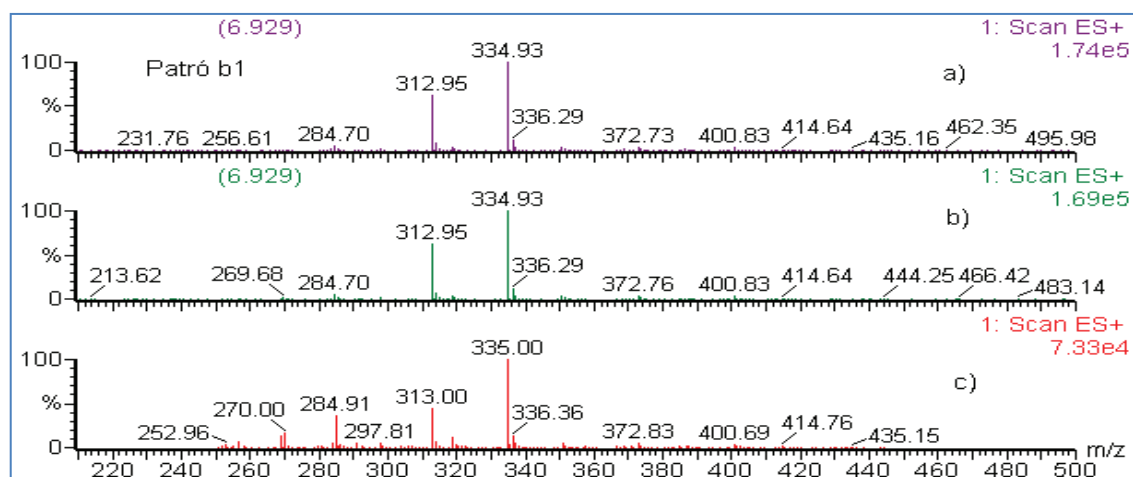


Figura 3.44. Correspon a l'espectre de masses en mode SCAN del patró de 0,4 mg/L d' aflatoxina B<sub>1</sub> (a) espectre del patró de 0,4 mg/L de la toxina B<sub>1</sub> a 20 V (b) espectre del patró de 0,4 mg/L de la toxina B<sub>1</sub> a 40 V (c) espectre del patró de 0,4 mg/L de la toxina B<sub>1</sub> a 40 V

A la Figura 3.45. es mostra l'espectre de masses de pic cromatogràfic de tr 6.80 de la Figura 3.43 que coincideix amb el tr de la toxina B<sub>1</sub>. Com es pot observar, les senyals de la Figura 3.44 i les de la Figura 3.45 no són iguals. Aquest fet corrobora que el resultat pel que fa a la producció d'aquesta toxina és negatiu.

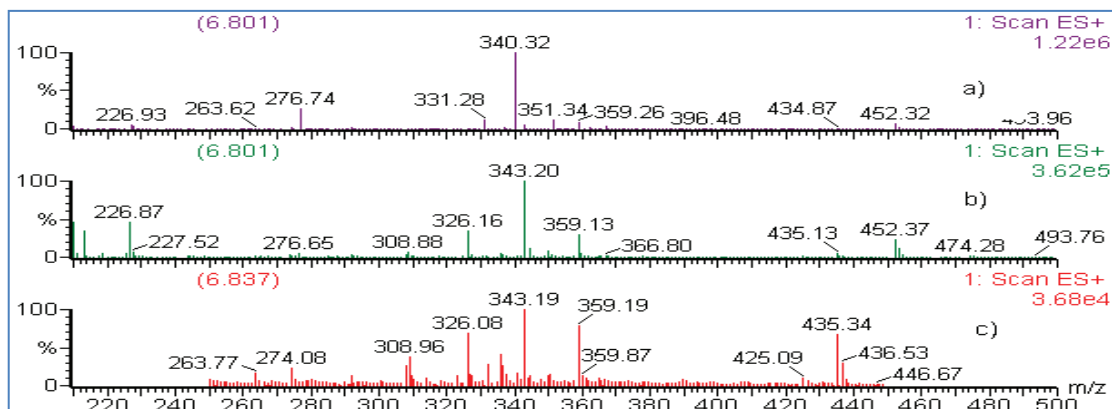


Figura 3.45. Correspon a l'espectre de masses en mode SCAN de la mostra de Blanes 7 dies (a) espectre del pic de la mostra de tr 6.801 a 20 V (b) espectre del pic de la mostra de tr 6.801 a 40 V (c) espectre del pic de la mostra de tr 6.801 a 60 V

Les comprovacions realitzades en mode SCAN i considerant que per a la producció de toxines s'han d'observar els seus pics en detector DAD i en mode SIR, podem concloure que les soques de control no produeixen ni aflatoxines ni l'OTA sobre compost procedent de les plantes de compostatge de Blanes i Manresa.

### 3.7. Comprovació de la capacitat micotoxigènica de la soca *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 sembrada primer sobre compost i després sembrada sobre arròs per UHPLC-UV.

Després d'haver comprovat la no producció d'aflatoxines per part de la soca *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 sobre compost, en la present tesi es planteja el següent experiment: comprovar si la soca de control *Aspergillus parasiticus* perd la seva capacitat micotoxigènica al ser sembrada sobre compost.

Per a fer-ho es realitza el següent procediment:

Dins un erlenmeyer de 100 ml es pesen 5 g de compost, se li addicionen 5 ml d'aigua desionitzada i s'autoclava a 121°C durant 15 min. El compost s'inocula amb 2 disquets de cultiu de la soca *Aspergillus parasiticus* CECT 2681. Per cada mostra, es sembren 3 erlenmeyers que s'incuben a 27°C durant 7 dies. Passat aquest període de temps, es pren mostra de cada un dels erlenmeyers, amb la nansa de Kolle i es sembren sobre plaques de petri. S'incuben les plaques a 27°C durant 7 dies. Es comprova al microscopi que és el fong *Aspergillus parasiticus*. Seguidament dins d'un erlenmeyer de 100 ml que conté 5 g d'arròs, se li addicionen 5 ml d'aigua desionitzada i s'autoclava a 121°C durant 15 min. L'arròs s'inocula, com s'ha dit anteriorment, amb 2 disquets del cultiu desenvolupat sobre les plaques de petri. Per cada mostra, es sembren 3 erlenmeyers que s'incuben a 27°C durant 7 dies. Es realitza l'extracció segons l'apartat 3.5.2 i s'analitza com es descriu a l'apartat 3.5.4.2. A la Figura 3.44 es mostra un esquema del procediment.

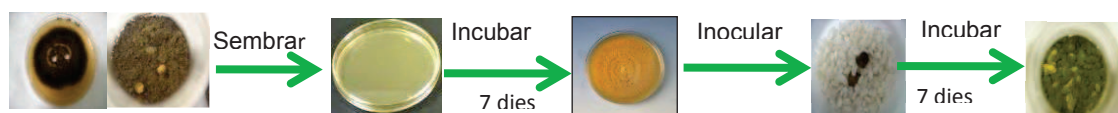


Figura 3.46. Esquema del procediment de comprovació e la pèrdua de capacitat micotoxigènica de la soca de control.

Juntament amb les tres mostres d'*Aspergillus parasiticus* inoculat sobre compost i després inoculat sobre arròs, se'n preparen al mateix temps tres més seguint el procediment de l'apartat 3.5.1 per tal de poder realitzar la comparació entre la mostra inoculada directament sobre arròs i la mostra inoculada primer sobre compost i després sobre arròs.

Les Figures 3.47 i 3.48 mostren el Cromatograma UV del patró d'aflatoxines d'1µg/L de concentració i el cromatograma UV de la producció de toxines per part de la soca d'*Aspergillus parasiticus* resembrada.

A la Taula 3.19. es mostren en primer lloc els resultat de la comparativa de producció d'aflatoxines realitzada entre la soca inoculada directament sobre arròs (A1) i la soca inoculada primer sobre compost i després sobre arròs (A2) i en segon lloc els coeficients de variació de la producció de cada una de les aflatoxines després d'haver realitzat tres repeticions per a cada mostra.

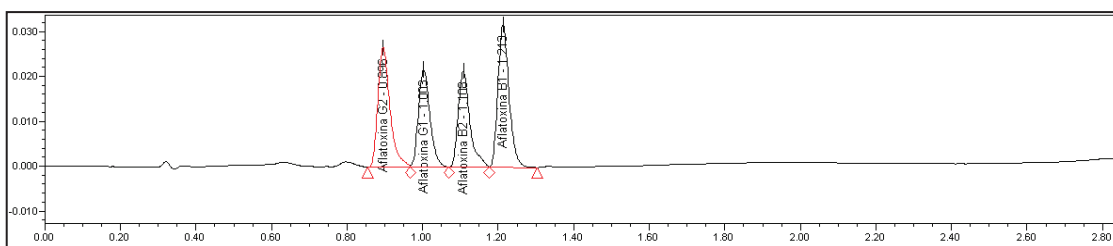


Figura 3.47. Cromatograma UV del patró d'aflatoxines d'1µg/L de concentració.

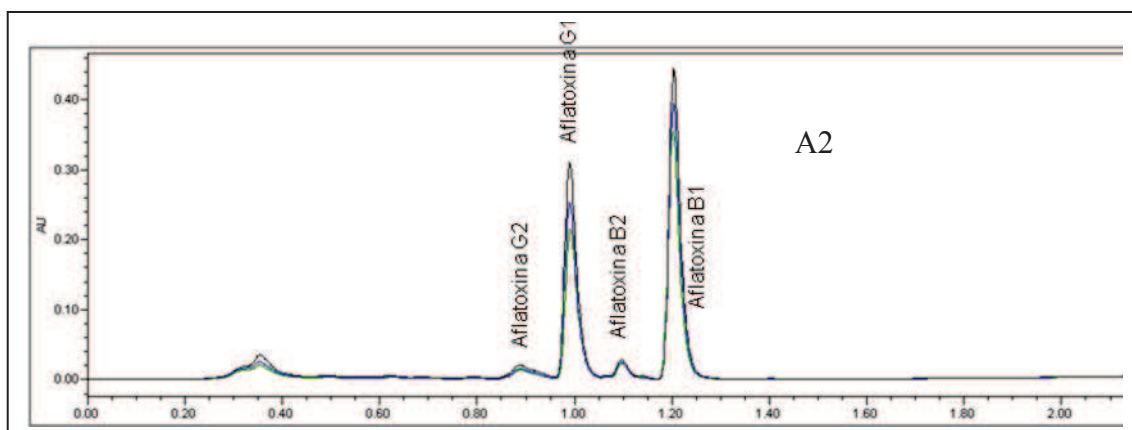


Figura 3.48. Cromatograma UV de la producció de toxines per part de la soca d'*Aspergillus parasiticus* (A2).

Tractament Mostra	G2 (mg/Kg)	CV G2	G1 (mg/Kg)	CV G1	B2 (mg/Kg)	CV B2	B1 (mg/Kg)	CV B1
A1	88	34%	578	10%	17	15%	618	10%
A2	88	28%	805	19%	24	12%	1004	12%

Taula 3.19. Comparativa de producció d'aflatoxines per part de la soca *Aspergillus parasiticus* en les mostres d'arròs (A1): soca inoculada directament sobre arròs, i (A2): soca inoculada primer sobre compost i després sobre arròs. Coeficients de variació per a cada aflatoxina segons l'anàlisi realitzat (tres repeticions).



Com es pot observar a la Taula 3.19, la soca control *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 no perd la capacitat micotoxigènica al ser incubada sobre compost i després sobre arròs ja que els valors de producció d'aflatoxines són similars als obtinguts quan la soca s'incuba directament sobre arròs.

### 3.8. Comprovació de la producció d'aflatoxines en matrius de barreges arròs i compost en diferent proporció per UHPLC-UV.

A l'apartat 3.7. s'ha comprovat que la soca de control *Aspergillus parasiticus* CECT 2981 no perd la seva capacitat micotoxigènica quan creix de nou sobre arròs, al ser recuperada després de ser sembrada sobre compost. L'objectiu d'aquest apartat és comprovar si el compost inhibeix la producció de les aflatoxines per part d'una soca productora quan aquesta està present en el substrat de creixement. Així s'estudiarà la influència de l'addició de compost, en diferents percentatges de concentració, a la matriu de creixement arròs.

El disseny de l'experiment es mostra a la Taula 3.20., on per una banda s'hi mostren les proporcions de les barreges realitzades d'arròs-compost, i, per l'altra, la proporció de dissolvent d'extracció que s'ha utilitzat en cada cas segons la proporció de la barreja arròs/compost. La proporció de dissolvent s'ha variat per a millorar l'extracció d'aflatoxines. De cada barreja se'n preparen tres mostres.

La preparació de l'inòcul s'ha fet seguint el procediment descrit a l'apartat 3.5.1, l'extracció segons els apartats 3.5.2 i 3.5.3 i el mètode cromatogràfic utilitzat és el que es descriu a l'apartat 3.5.4.2 (2).

Matriu (n=3)	Pes Arròs (g)	PesCompost(g)	Extracció MeOH : H <sub>2</sub> O
Arròs (1)	5	0	90:10
Arròs 80 (2)	4	1	90:10
Arròs50 (3)	2,5	2,5	90:10
Arròs 20 (4)	1	4	70:30
Compost (5)	0	5	70:30

Taula 3.20. Barreges realitzades d'arròs-compost amb la proporció d'eluent que s'ha utilitzat en cada mostra per a l'extracció de les toxines.

A continuació es mostren els cromatogrames obtinguts per a cada una de les anàlisis de les barreges d'arròs-compost realitzades. La Figura 3.49 és el cromatograma UV del patró d'aflatoxines de concentració 1 µg/L. A les Figures 3.50 - 3.51 es mostren els resultats obtinguts després d'incubar el fong sobre les diferents proporcions arròs: compost

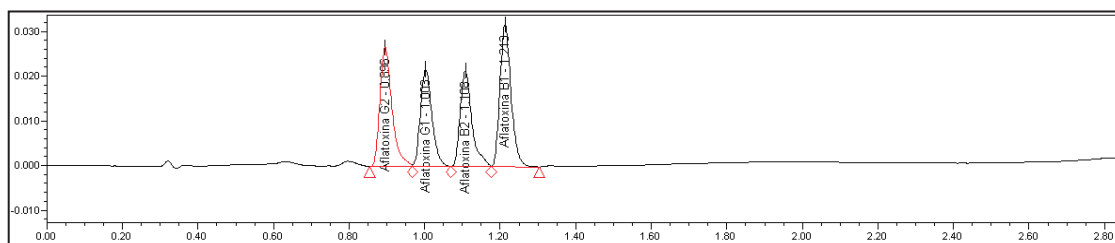


Figura 3.49. Cromatograma UV del patró d'1 µg/L de concentració de cada una de les quatre aflatoxines

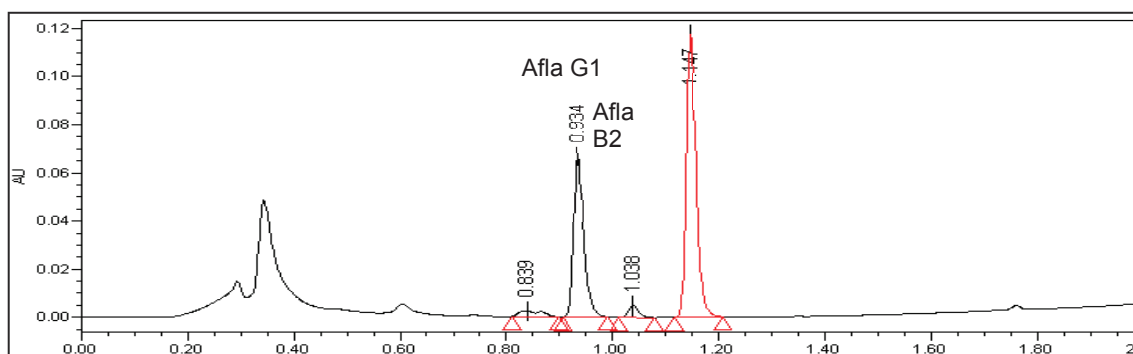


Figura 3.50. Cromatograma UV de l'extracte del cultiu de la mostra (2) d'arròs 80%, 20 % compost després de ser incubada a 27°C durant 7 dies, després de la sembra de 2 disquets de cultiu de la soca *Aspergillus parasiticus* CECT 2681.

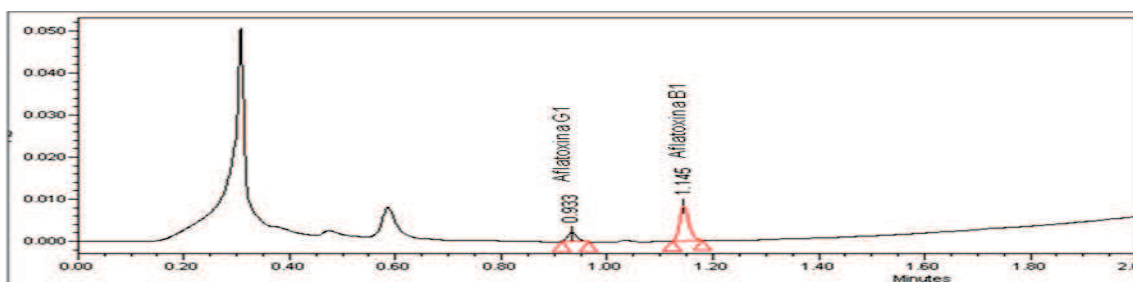


Figura 3.51. Cromatograma UV de l'extracte del cultiu de la mostra (4) d'arròs 20%, compost 80% després de ser incubada durant 7 dies a 27°C, després de la sembra de 2 disquets de cultiu de la soca *Aspergillus parasiticus* CECT 2681.

A la Figura 3.51. s'observa com en la proporció Arròs 20% (80% compost), ja no es detecten ni l'aflatoxina G<sub>2</sub> ni la B<sub>2</sub>.

La Figura 3.52. mostra el solapament entre dos cromatogrames realitzats amb el detector UV, el d'Arròs 100%, mostra (1), i el de compost 100% mostra (5). Com es pot observar, la producció de toxines en compost no es detecta per sobre del límit de detecció del mètode.

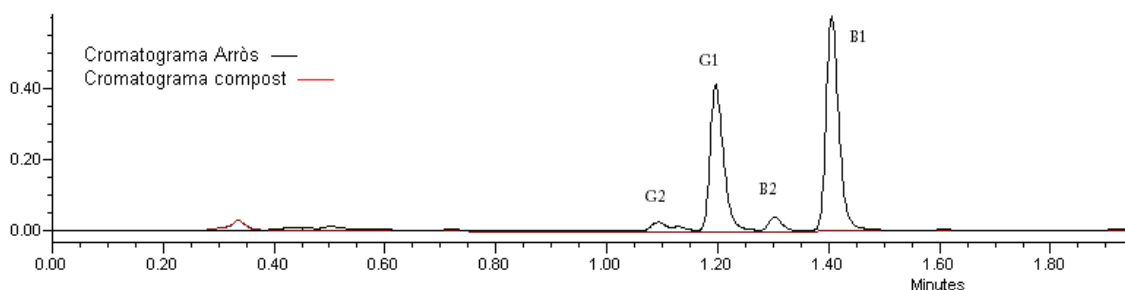


Figura 3.52. Cromatograma UV de l'extracte del cultiu de les mostres d'Arròs (1) i Compost (5) després de ser incubada durant 7 dies a 27°C, després d'haver estat inoculat amb 2 discos de cultiu de la soca *Aspergillus parasiticus* CECT 2681.

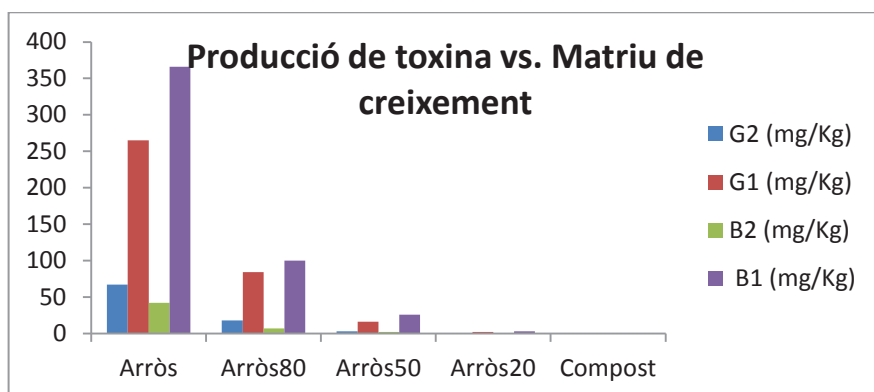
A continuació, es presenta a la Taula 3.21. els resultats de la producció de les aflatoxines per part de la soca control *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 en els diferents experiments duts a terme. Es pot observar que la producció de toxines disminueix a l'augmentar el percentatge de compost en la composició del substrat de creixement. La producció de toxines quan el fong es desenvolupa sobre només arròs (Arròs100) és 3,5 vegades major que la de la mescla Arròs80. La producció sobre Arròs80 és 4,4 major que la de l'Arròs50. També s'hi mostren els càlculs dels coeficients de variació (per n=3), calculats per a cada una de les aflatoxines, segons la barreja de substrat de creixement realitzada.

Aquests resultats permeten afirmar que el compost inhibeix la producció d'aflatoxines.

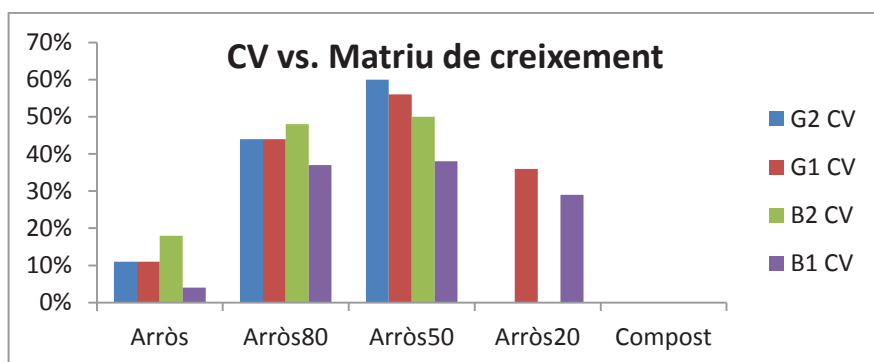
Matriu	G2 (mg/Kg)	G2 CV	G1 (mg/Kg)	G1 CV	B2 (mg/Kg)	B2 CV	B1 (mg/Kg)	B1 CV
<b>Arròs</b>	67	11%	265	11%	42	18%	366	4%
<b>Arròs80</b>	18	44%	84	44%	7	48%	100	37%
<b>Arròs50</b>	3	60%	16	56%	2	50%	26	38%
<b>Arròs20</b>	<0,0006	--	2	36%	<0,0004	--	3	29%
<b>Compost</b>	<0,0006	--	<0,0007	--	<0,0004	--	<0,0004	--

Taula 3.21. Càlcul de la producció d'aflatoxines en les diferents barreges arròs–compost realitzades.

La representació gràfica de les dades de la Taula 3.21. es mostra en els Gràfics 3.1, on s'hi visualitza la producció de toxines vs. matriu de creixement i 3.2, on s'hi presenten els CV.



Gràfic 3.1. Relació de la producció d'aflatoxines segons la composició del substrat de creixement.



Gràfic 3.2. Relació dels coeficients de variació de la producció d'aflatoxines segons la composició del substrat de creixement.

La Figura 3.53. mostra les barreges arròs-compost després de ser inoculades amb dos disquets de cultiu de la soca de control i incubades durant 7 dies a 27°C.



Figura 3.53. Mostra d'Arròs 100%, Arròs 50 % i Compost 100% després de ser inoculada amb dos disquets de cultiu del fong *Aspergillus parasiticus* i incubada durant 7 dies a 27°C.

S'observa que el fong inoculat creix en tots els casos, també quan la matriu és només compost, tot i que és en arròs on s'observa un major creixement.

### 3.9. Resum dels apartats 3.6, 3.7 i 3.8

En el present apartat es resumeixen dades els resultats obtinguts pel que fa referència a la producció de toxines, segons el substrat de creixement i segons el tractament de mostra que es realitza.

S'ha comprovat que la soca de control *Aspergillus parasiticus* CECT 2681, produeix aflatoxines quan es sembrada sobre arròs però no sobre compost i que la producció de toxines disminueix a mesura que augmenta la proporció de compost respecte l'arròs en el substrat de creixement.

També s'ha comprovat que la soca de control no perd la seva capacitat micotoxigènica al ser inoculada sobre compost i després sobre arròs.

A la Taula 3.22 es mostren els valors de la producció total de toxines segons la composició del substrat de creixement, segons el detector i el mètode utilitzat i segons el tractament donat a la mostra, concretament les mostres de l'apartat 3.7.

La mostra (A1) és la producció de la soca control inoculada sobre arròs i la mostra (A2) és la producció de la soca inoculada sobre arròs i després sobre compost.

Matriu	Detector	Mètode	Total aflatoxines (mg/Kg)
Arròs	MS	1	305
Arròs	DAD	1	415
Arròs (A1)	UV	2	1301
Arròs (A2)	UV	2	1921
Arròs100	UV	2	740
Arròs80	UV	2	209
Arròs50	UV	2	47
Arròs20	UV	2	5
Compost	MS/DAD/UV	1,2	--

Taula 3.22. Valors de la producció total de toxines.

Els diferents experiments exposats fins ara al llarg de la part experimental mostren que les soques *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 i *Aspergillus ochraceus* CECT 2948 descrites com a productores de les aflatoxines i OTA respectivament, produeixen efectivament les toxines sobre arròs, però no ho fan sobre compost.

**3.10. Comprovació de la producció de les aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> i l'ocratoxina A per part dels fongs aïllats de les mostres de les plantes de Blanes i Manresa i de les diferents mostres de composts finals.**

En aquest apartat, es vol estudiar si els fongs dels gèneres *Aspergillus* i *Penicillium* aïllats de les diferents mostres de compost analitzades poden produir aflatoxines o ocratoxina A sobre arròs; és a dir, en un substrat de creixement on la producció de toxines es veu afavorida si la soca fúngica té capacitat d'elaborar-les.

Per això, després d'haver aïllat els fongs de les diferents mostres analitzades en aquest treball i identificat els que pertanyen a gèneres potencialment aflatoxigènics, se'n realitza la inoculació sobre arròs tal com s'ha descrit en l'apartat 3.5.1. L'extracció es realitza com es descriu a l'apartat 3.5.2 del present treball i l'anàlisi seguint el mètode cromatogràfic utilitzat és el descrit a l'apartat 3.5.4.2 (1).

## PART EXPERIMENTAL I DISCUSSIÓ DE RESULTATS

A la Taula 3.23, es presenten el total de mostres analitzades, és a dir, els fongs dels gèneres *Aspergillus* i *Penicillium* estudiats, indicant-se a partir de quina mostra van ser aïllats.

Mostra	Gènere
<b>M inici</b>	1 soca <i>Penicillium</i>
	3 soques <i>Aspergillus</i>
<b>M meitat túnel</b>	2 soques <i>Aspergillus</i>
<b>M final túnel</b>	3 soques <i>Aspergillus</i>
<b>M 2 mesos</b>	2 soques <i>Aspergillus</i>
<b>M 3mesos</b>	1 soca <i>Aspergillus</i>
	1 soca <i>Penicillium</i>
<b>B inici</b>	1 soca <i>Penicillium</i>
	1 soca <i>Aspergillus</i>
<b>B final túnel</b>	1 soca <i>Aspergillus</i>
<b>B 3 mesos</b>	1 soca <i>Aspergillus</i>
<b>C casolà 1</b>	1 soca <i>Aspergillus</i>
	1 soca <i>Penicillium</i>
<b>C casolà 2</b>	1 soca <i>Aspergillus</i>

Taula 3.23. Fongs dels gèneres *Aspergillus* i *Penicillium* aïllats de cada una de les mostres analitzades.

A continuació, a la Figura 3.54, es mostren els cromatogrames obtinguts d'un patró de 0,4 mg/L de les toxines i, a mode d'exemple, el de l'extracte del cultiu en arròs de un fong del gènere *Aspergillus* que s'ha aïllat de la mostra de compost de Manresa final i que s'ha incubat durant 21 dies a 27°C per estudiar si és capaç de produir les cinc micotoxines.

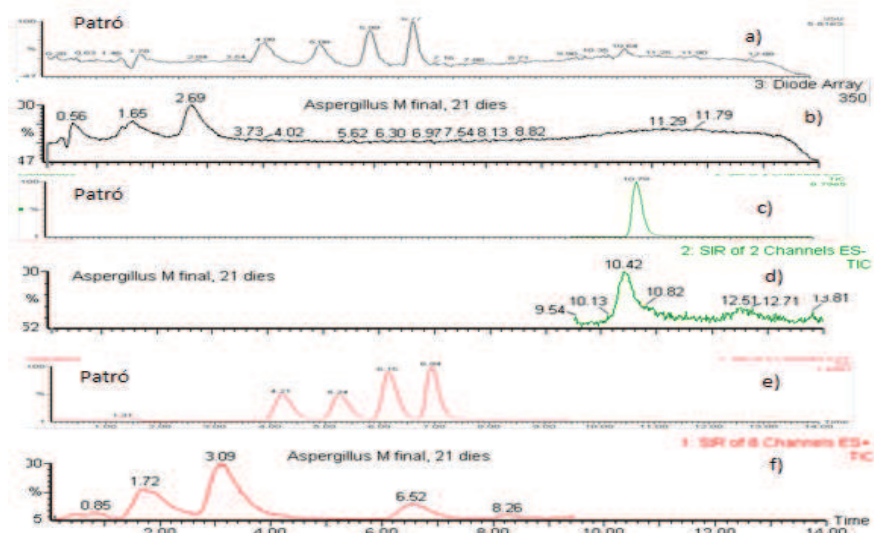


Figura 3.54. Cromatograma d'un patró d'aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> i OTA d'una concentració de 0,4mg/L de cadascuna de les toxines i de l'extracte del cultiu del fong del gènere *Aspergillus* sobre arròs, aïllat de la mostra de Manresa final incubat durant 21 dies a 27°C (a) Cromatograma del patró en detector DAD a 350 nm (b) Cromatograma de l'extracte de cultiu de la soca d'*Aspergillus* en detector DAD a 350 nm (c) Cromatograma del patró en mode SIR- (d) Cromatograma de l'extracte del cultiu en arròs de la soca en mode Sir- (e) Cromatograma del patró en mode Sir+ (f) Cromatograma de la l'extracte del cultiu en arròs de soca en mode Sir+.

Les senyals observades a la Figura 3.54. no coincideixen amb els temps de retenció de les toxines estudiades. Es considera que perquè hi hagi producció de toxines, els cromatogrames estudiats han de presentar pics als tr del patró simultàniament en DAD i mode SIR- o SIR+.

Es conclou que cap dels 20 fongs del gènere *Aspergillus* i *Penicillium* analitzats no han produït aflatoxines, per sobre de 0,5 mg/kg de mostra, ni OTA per sobre de 0,05 mg/kg de mostra, al ser incubats sobre arròs a 27°C, durant 7,14, i 21 dies.



CONCLUSIONS.

---

A continuació es recullen les conclusions obtingudes a partir dels experiments descrits en els diferents apartats d'aquesta tesi doctoral, segons els objectius plantejats inicialment i en funció dels resultats obtinguts:

a) Cap dels fongs dels gèneres *Aspergillus* i *Penicillium* aïllats de les mostres de compost final ni de les mostres obtingudes durant el procés de compostatge, ha sigut capaç de produir -quan s'incuben sobre arròs a 27°C- aflatoxines o OTA en concentracions iguals o superior als límits de detecció dels diferents mètodes cromatogràfics emprats.

b) S'ha comprovat que *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 produeix les aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub> quan creix sobre arròs. Ara bé, quan aquest es desenvolupa sobre arròs al qual s'hi han afegit concentracions creixents de compost, disminueix la producció d'aquestes micotoxines, no podent-se detectar les quatre aflatoxines a partir d'una concentració del 20% de compost en arròs.

c) *Aspergillus ochraceus* CECT 2948, productora d'OTA sobre arròs, no ha estat capaç de produir aquest metabòlit per sobre del límit de detecció quan s'ha incubat sobre compost.

Considerant les tres premisses anteriors es conclou que:

1.- Malgrat que s'han identificat 13 gèneres de fongs diferents a partir de les mostres analitzades, -d'entre ells 16 soques dels gèneres *Aspergillus* i 4 del gènere *Penicillium*-, el procés de compostatge no permet que aquests fongs produeixin aflatoxines ni OTA en concentracions superiors al límit de detecció dels equips utilitzats. Els gèneres *Aspergillus*, *Acremonium*, *Mucor* i *Trichoderma*, fongs ambientals molt habituals, són els que es troben en la majoria de les mostres analitzades.

2.- Després dels estudis realitzats amb soques control productores d'aflatoxines i d'OTA, es conclou que el compost no és un substrat adequat per a la producció de les micotoxines.

BIBLIOGRAFIA.

---

- Abramson, D. Measurement of ochratoxin A in barley extracts by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* (1987) 391, 315-320.
- Agència Catalana de l'Aigua. Utilització de fangs de depuradora en restauració. Barcelona. (2008).
- Agència Catalana de l'Aigua. Programa d'actuacions per a la gestió dels Fangs de depuració d'aigües residuals urbanes" (2006-2015). Barcelona. (2010).
- Alfaro, C., F. Broto-Puig, M. Agut i L. Comellas. Estudio de la producción de aflatoxinas B1, G1, B2 y G2 en semillas de anacardo por parte de *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 mediante cromatografía líquida de ultra-alta resolución. *Afinidad.* (2013) 563, 171-174.
- Alsberg, C. L. i O. F. Black. Contributions to the study of maize deterioration: biochemical and toxicological investigations of *Penicillium puberulum* and *Penicillium stoloniferum*. *Bull. Bur. Anim. Ind.* (1913) 270, 1-47.
- Arco, N. i J. Romanyà. Guia de fonts de matèria orgànica apta per l'agricultura ecològica a Catalunya. Ed. Dep productes naturals, biologia vegetal i edafologia- Facultat de farmàcia - Universitat de Barcelona. Barcelona. (2012)
- Association of official analytical chemists (AOAC). Official methods of analysis of AOAC International. Ed. *Dr. William Horwitz* (2003). Estats Units.
- Association of official analytical chemists (AOAC). Official methods of analysis of AOAC International. Ed. *Dr. William Horwitz* (2009). Estats Units.
- Bagó, B. Análisis de diversos contaminantes orgánicos en fangos de depuradora y estudio de su evolución en los procesos de postratamiento. Tesis Doctoral 2005. Universidad Ramon Llull. [Director de la Tesis: Dr. Lluís Comellas Riera].
- Barnett, H. L. i B. Hunter. Illustrated genera of imperfect fungi. Ed. Burgess Publishing Company. Estats Units. (1972)
- Becker, M., P. Degelmann, M. Herderich, P. Schreier i H. U. Humpf. Column liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry for the analysis of ochratoxin A. *J. Chromatogr. A.* (1998) 818, 260-264.
- Bing-Chung, L., J. Ting-Ting, L. Maw-Rong i J. C. Chieh-Ming. Supercritical fluid extraction and quantification of aflatoxins in Zizyphi Fructus by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* (2007) 5, 667-673.
- Bloom, E. K. Bal, E. Nyman, A. Must i L. Larson. Mass Spectrometry-Based strategy for direct detection and quantification of some mycotoxins produced by *Strachybotrys* and *Aspergillus* spp. in indoor environments. *Applied and environmental microbiology.* (2007) 73, 4211-4217.
- Bu'Lock, J. D. Aspects of secondary metabolism in fungi. Ed. *Academic Press*. New York. (1965).
- Bullerman, L. B. Effects of potassium sorbate on growth and ochratoxin production by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium* species. *J. Food Protec.* (1985) 48, 162-165.

- Cappiello, A., G. Famiglini i B. Tirillini. Determination of aflatoxins in peanut meal by LC/MS with a particle beam interface. *Chromatographia*. (1995) 40, 411-416.
- Castegnaro, M., D. C. Hunt, E. B. Sansone, P. L. Schuller, M. G. Siriwardana, G. M. Telling, H. P. van Egmond i E. A. Walker. Laboratory decontamination and destruction of aflatoxins B1, B2, G1, G2 in laboratory wastes. *IARC Scientific Publications*. (1980) 37, 1-59.
- Cole, R.J., T. H. Sanders, R. A. Hill i P. D. Blankenship. Mean geocarposphere temperatures that induce preharvest aflatoxin contamination of peanuts under drought stress. *Mycopathologia*. (1985) 91, 41-46.
- Cole, R. J. i J. W. Dorner. Extraction of aflatoxins from naturally contaminated peanuts with different solvents and solvent/peanut ratios. *J. AOAC Int.* (1994) 77, 1509-1511.
- Cole, R. J. i J. W. Cox. Handbook of tòxic fungal metabolites. Ed. *Academic Press* (1981). Nova York.
- Comeau, M. i Conan G. Y. Funtional maturity and terminal molt of male snow crab, *Chionoecetes opilio*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. (1986) 43, 1710-1719
- Croft, W. A., B. B. Jarvis i C. S. Yatawara. *Airborne outbreak of trichothecene toxicosis. Atmospheric Enviroment*. (1986).
- Dapena-Mora A., A. Campos, J. L., Mosquera-Corral i R. Mendez. Anamox process for nitrogen removal from anaerobically digested fish canning effluents. *Water Science and Technology*. (2006) 53, 205-274.
- Dawlatana, M., R. D. Coker, M. J. Nagler i G. Blunden. A normal phase HPTLC method for the quantitative determination of ochratoxin A in rice. *Chromatographia*. (1996) 42, 25-28.
- Davis, N. D. i U. L. Diener. Environmental factors affecting the production of aflatoxin. *Jap. Conf. Toxic Micro-Organisms*. (1968) 43-47.
- Davis, N. D., J. W. Searey i U. L. Diener. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in a semisynthetic medium. *Appl. Microbiol.* (1969) 17, 742-744.
- de longh, H., R. O. Vles i J.G. van Pelt. Milk on mammals fed an aflatoxin containing diet. *Nature*. (1964) 202, 466-467.
- Déportes, I., S. Krivobok, F. Seigle-Murandi i D. Z Mirou. Aflatoxins in Municipal Solid Wastes Compost? A First Answer. *J. Agric. Food Chem.* (1997) 45, 2788-2792.
- Doyle, M. P., L. R. Beuchat i T. J. Montville. Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras. Ed. Acribia. Saragossa. (2000).
- Dunne, C, M. Meaney, M, Smyth i L.G. Tuinistra. Multimycotoxin detection and clean-up method for aflatoxins, ochratoxin and zearaleone in animal feed ingredients using high-performance líquid chromatography and gel permeation chromatography. *J. Chromatogr.* (1993) 629, 229-235.
- Ellis, R. H. The longevity of seeds. *Hort Science*. (1991) 26, 1119 -1125.

FAO. Ministerio de economía, industria y comercio. Comisión coordinadora del Codex. Proyecto TCP/RLA/0065. San José, Costa Rica. (2002).

Ferreira, N. P. i M. J. Pitout. The biosynthesis of ochratoxin. *Journal of the South African Chemical Institute*. (1969) 22, S1.

Food and Drug Administration (FDA). *Bacteriological analytical manual*. Estats Units. (1998).

Frohlich, A. A., R. R. Marquardt i A. Bernatsky. Quantitation of ochratoxin A: Use of reverse phase thin-layer chromatography for sample cleanup followed by liquid chromatography or direct fluorescence measurement. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*(1988) 71, 949-952.

Guia del compostatge dels recursos orgànics produïts a les llars 2006. Ed: Mancomunitat la plana. Barcelona. (2006)

Gimeno, A. i M. L. Martins. Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos. Ed. *Special Nutrients Inc.* (2003). Argentina.

Göbel, R i K. Lusky. Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, and zearalenone in grains by immunoaffinity column/liquid chromatography. *J. AOAC Int.* (2004) 87, 411-416.

Gregg, M., L. Marilyn, E. G. Browne, M. Kenneth i F. William. Ambient air levels of *Aspergillus fumigatus* and thermophilic actinomycetes in a residential neighborhood near a yard-waste composting facility. *Aerobiologia*. (2001) 17, 99-108.

Hirsch, C. F. Regulation of secondary metabolism in microorganisms. Ed. *D. Schlessinger*. (1981) Washington. D. C.

Horie, Y. Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*. *Nippon Kingakukai Kaiho*. (1995) 36, 73-76.

Huff, W. E i P. B. Hamilton. Mycotoxins- their biosynthesis in fungi: ochratoxins-metabolites of combined pathways. *Journal of Food Protection*. (1979) 42, 815-820.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Overall Evaluations of Carcinogenicity. Ed. *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. (1987) França.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Ed. *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. (1993). França.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Ed. *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. (2002). França.

Jansen, H., R. Jansen, U. A. Th. Brinkman i R. W. Frei. Fluorescence enhancement for aflatoxins in HPLC by post-column split-flow iodine addition from solidphase iodine reservoir. *Chromatographia*. (1987) 24, 555-559.

- Jiujiang Y. i C. Kenneth. Aflatoxins Biosynthetic Pathway and Pathway Genes, Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology. (2011). Ed: Dr. Ramon Guevara-Gonzalez. Nova Orleans. (2011).
- Jonsyn F. E., S. M. Maxwell, i R. G. Hendrickse. Humans fetal exposure to ochratoxin A and aflatoxins. *Annals of Tropical Paediatrics*. (1995) 15, 3-9.
- Jorgensen, K. i M. Vahl. Analysis of ochratoxin A in pig kidney and rye flour using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* (1999) 16(11), 451-456.
- Kelkar, H. S., T. W. Skloss, J. F. Haw, N. P. Keller i T. H. Adams. *Aspergillus nidulans* stcL encodes a putative cytochrome P-450 monooxygenase required for bisfuran desaturation during aflatoxin/sterigmatocystin biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. (1997) 272, 1589-1594
- Keller N. P. i G. Turner. Fungal secondary metabolites- from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*. (2005) 3 (12), 937-947.
- Kok, W. T., T. C. H. van Neer, W. A. Traag, i L. G. M. T. Tuinstra. Determination of aflatoxins in cattle feed by liquid chromatography and post-column derivatization with electrochemically generated bromine. *J. Chromatogr.* (1986) 367, 231-236.
- Kuiper-Goodman, T. i P. M. Scott. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sci.* (1989) 2, 179-248.
- Kussak, A., C. A. Nilson, B. Andersson i J. Langridge. Determination of aflatoxins in dust and urine by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* (1995) 9, 1234-1237.
- Lancaster, M. D., F. P. Jenkins i J. M. Phillip. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature*. (1961) 192, 1095-1096.
- Lin, L., J. Zhang, P. Wang, Y. Wang i J. Chen. Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. *J. Chromatogr. A*. (1998) 815, 3-20.
- Machinski, J. M., L. M. Valente Soares, E. Sawazaki, D. Bolonhezi, J. L. Castro i N. Bortolotto. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. *J. Sci. Food Agric.* (2001) 81, 1001-1007.
- Magan, N. i J. Lacey. Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* (1984) 82, 71-81.
- Marais, G., R. E. Loewenthal, i I. P. Siebritz. Observations supporting phosphate removal by biological excess uptake. *Wat. Sci. And Tech.* (1983) 15, 15-41
- Marquardt, R. R., A. A. Frohlich, O. Sreemannarayana, D. Abramson, i A. Bernatsky. Ochratoxin A in blood from slaughter pigs in Western Canada. *Can. J. Vet. Res.* (1988) 52, 186-190.
- Navajas, H. Anàlisi simultània d'aflatoxines i ocratoxina A en compost. Projecte Final de Carrera 2008. Universitat Ramon Llull. [Directors del Projecte: Dr. Lluís Comellas Riera i Dra. Montserrat Agut Bonsfills].

- Navajas, H., F. Broto-Puig, M. Agut i L. Comellas. Análisis simultáneo de aflatoxinas y ocratoxina A en compost por HPLC-MS. *Afinidad*. (2010) 546, 94-99
- Nesbitt, B. F., L. O'Kelly, K. Sargeant i A. Sheridan. *Aspergillus flavus* and turkey X disease. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*. (1962) 195, 1062-1063.
- Nesheim, S., M. E. Stack, M. W. Trucksess i R. M. Eppley. Rapid solvent-efficient method for liquid chromatographic determination of ochratoxin A in corn, barley, and kidney: collaborative study. *J. AOAC. Int.* (1992) 75, 481-487.
- Northolt, M. D. i L. B. Bullerman. Prevention of mould growth and toxin production through control of environmental conditions. *J. Food Protec.* (1982) 45, 519-526.
- Petterson, M. i A. P. Damoglou. The effect of water activity and pH on the production of mycotoxins by fungi growing on a bread analogue. *Lett. Appl. Microbiol.* (1986) 3, 123-125.
- Pitt, J. I. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Ed. *Academic Press*. Londres. (1979).
- Pitt, J. I. A Laboratory guide to common *Penicillium* species. Ed. *CSIRO Division of Food Processing*. Australia. (1988).
- Pitt, J. I. i A. D. Hocking. Fungi and food spoilage. 2a Ed. Chapman and Hall. Londres. (1997)
- Pitt, J. I. i L. Leistner. Toxigenic *Penicillium* species de Mycotoxins and animal foods. Ed. J. E. Smith i R. S. Henderson. *CRC Press*. Boca Raton. Fla. (1991)
- Previdi, P. i M. Casolari. Le aflatossine, Industria Conserve edn. (1986).
- Raper, K. B. i D. I. Fennell. The genus *Aspergillus*. Ed. *Williams and Wilkins Co.*(1965). Baltimore.
- Rajakylä, E., K. Laasasenhaho i P. J. D. Sakkers. Determination of mycotoxins in grain by high-performance liquid chromatography and thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* (1987) 384, 391-402.
- Samson, R. A., A. D. Hocking, J. I. Pitt i A. D. King. Modern methods in food mycology. Ed. *Elsevier*. Amsterdam. (1992)
- Samson, R. A., E. S. Hökstra, J. C. Frisvad i O. Filtenborg. Introduction to food and airborne fungi. Ed. *Centraalbureau voor schimmelcultures*. Països Baixos. (2000)
- Sargeant, K., A. Sheridan, J. O'Kelly i R. B. A. Carnaghan. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature* (1961) 192, 1096-1097.
- Scudamore, K. A. i S. MacDonald. A collaborative study of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunoaffinity column clean-up. *Food Addit. Contam.* (1998) 15, 401-410.
- Shepherd, M. J. i J. Gilbert. An investigation of HPLC post-column iodination conditions for the enhancement of aflatoxin B1 fluorescence. *Food Addit. Contam.* (1984) 1, 325-335.



- Spinosa, L. i P. A. Vesilind. Sludge into biosolids: processing, disposal and utilization. IWA Publication, 2001
- Stack, M. E. Toxins a Handbook of thin layer chromatography. Ed. *Marcel Dekker*. New York. (1996)
- Steele, J. A., N. D. Davis i U. L. Diener. Effect of Zinc, copper, and iron on ochratoxin A production. *Appl. Microbiol.* (1973) 25, 847-849.1973
- Stolff, L. Aflatoxin M1 in perspective. *J. Food Protec.* (1980) 43(3), 226-230.
- Stroka, J., E. Anklam, U. Jörisen i J. Gilbert. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study. *J. AOAC Int.* (2000a) 83, 320-340.
- Suh, Y. J. i P. Rousseaux. An LCA alternative wastewater sludge treatment scenarios. *Resources Conservation and Recycling.* (2002) 35, 191-200
- Sweeney, M. J. i A. D. W. Dobson. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.* (1998) 43, 141-158.
- Tabata, S., H. Kamimura, A. Ibe, H. Hashimoto, Y. Tamura, i T. Nishima. Aflatoxin contamination in foods and foodstuffs in Tokyo: 1986-1990 *J. AOAC Int.* (1993) 76, 32-35.
- Tanaka, T., A. Yoneda, Y. Sugiura, S. Inoue, M. Takino, A. Tanaka, A. Shinoda, H. Suzuki, H. Akiyama i M. Toyoda. An application of liquid chromatography and mass spectrometry for determination of aflatoxins. *Mycotoxins* (2002) 52, 107-113.
- Tarter, E. J., J. P. Hanchay i P.M. Scott. Improved liquid chromatographic method for determination of aflatoxins in peanut butter and other commodities. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* (1984) 67, 597-600.
- Thiel, P. G., S. Stockenström, i P. S. Gathercole. Aflatoxin analysis by reverse phase HPLC using post-column derivatization for enhancement of fluorescence. *J.Liq. Chromatogr.* (1986) 9, 103- 112.
- Thornton, P. K. i M. Herrero. The inter-linkages between rapid grow in livestock production climate change, and the impacts on water resources, land use, and deforestation. The World Bank, Washington DC, USA. (2010).
- Trucksess, M. W., J. Giler, K. Young, K. D. White i S. W. Page. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley, and coffe. *J. AOAC Int.*(1999) 82, 85-89.
- Tuomi, T., T. Johnsson, E-L. Hintikka i K. Reijula. Detection of aflatoxins (G1-2, B1-2), sterigmatocystin, citrinine and ochratoxin A in samples contaminated by microbes. *Analyst* (2001) 126, 1545-1550.
- Ueno, Y. i I. Ueno. Isolation and acute toxicity of citreoviridin, a neurotoxic mycotoxin of *Penicillium citreo-viride* Biourge. *Japanese. J. Exp. Med.* (1972). 42, 91-105.
- van der Merwe, K. J., P. S. Steyn, L. Fourie, D. B. Scott i J. J. Theron. Ochratoxin A, a tòxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. *Nature.* (1965) 205, 1112-1113.

van der Merwe, K. J., P. S. Steyn i L. Fourie. Mycotoxins. II. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus*. *Nature*. (1965) 7083-7088.

Ventura, M., Vallejos, I. Anaya, F. Broto-Puig, M. Agut i L. Comellas. Analysis of ochratoxin A in coffee by solid-phase clean up and narrow-bore liquid chromatography-fluorescence detector-mass spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* (2003). 51, 7564-7567.

Ventura, M., A. Gómez, I. Anaya, J. Díaz, F. Broto-Puig, M. Agut i L. Comellas. Analysis of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> in medicinal herbs by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. (2004) 1048, 25-29

Ventura, M. Desenvolupament de mètodes cromatogràfics per a l'anàlisi d'aflatoxines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> i ocratoxina A en productes d'origen animal. Tesis Doctoral 2005. Universitat Ramon Llull. [Directors de la Tesis: Dra. Montserrat Agut Bonsfills i Dr. Lluís Comellas Riera].

Wei, R. D., F. M. Strong i E. B. Smalley. Incorporation of chlorine-36 into ochratoxin A. *Applied Microbiology*. (1971) 22, 276-277.

Weidenbörner, M. Encyclopedia of Food Mycotoxins. Ed. Springer. Berlin. (2001)

[www.20.gencat.cat](http://www.20.gencat.cat), consultada el 14/12/2012.

[www.anses.fr](http://www.anses.fr), Agense nationale de seécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, consultada el 14/04/2014

[www.ccvoc.org](http://www.ccvoc.org), consultada el 01/11/2012.

[www.chm.ac.uk](http://www.chm.ac.uk), University of Bristol. School of Chemistry, consultada el 14/11/2013.

[www.enviroconsult.fr](http://www.enviroconsult.fr), consultada el 16/04/2014.

[www.epa.gov](http://www.epa.gov), U.S Environmental Protection Agency, consultada el 6/09/2013.

[www.gencat.cat/salut/acsa/](http://www.gencat.cat/salut/acsa/), Agència Catalana de Seguretat Alimentària, consultada el 14/04/2014.

[www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com), consultada 01/10/2013.

[www.rsc.org](http://www.rsc.org), RSC, Advancing the Chemical Sciences, consultada 06/09/2013.

[www.scielo.org.ar](http://www.scielo.org.ar), consultada el 6/11/2013.

[www.services.leatherheadfood.com](http://www.services.leatherheadfood.com), consultada el 6/11/2013.



---

# *Evaluación mediante HPLC-MS de la capacidad de producción de Aflatoxinas y Ocratoxina A por parte de 20 cepas de Aspergillus y Penicillium aisladas de compost*

Anna Cuadrench-Tripiana, Montserrat Agut\* y Lluís Comellas  
IQS School of Engineering, Universitat Ramon Llull.

---

*Evaluation by means of HPLC-MS of Aflatoxins and OTA production by 20 strains of Aspergillus and Penicillium isolated from compost*

*Avaluació mitjançant HPLC-MS de la capacitat de producció d'Aflatoxines i Ocratoxina A per part de 20 soques d'Aspergillus i Penicillium aïllades de compost*

*Rebut: 26 de novembre de 2013; revisat: 19 de febrer de 2014; acceptat: 20 de febrer de 2014*

## RESUMEN

Este artículo aporta los resultados obtenidos tras realizar el aislamiento e identificación de los mohos presentes en muestras obtenidas en los distintos estadios de la producción de compost en dos plantas de compostaje catalanas (Blanes y Manresa), así como de muestras de compost final de distintos orígenes.

Identificados los mohos, se evalúa la capacidad de producir aflatoxinas y ocratoxina A de las cepas pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* utilizando cromatografía HPLC-MS. Se concluye que ninguna de las cepas aisladas es capaz de producirlas.

**Palabras clave:** Aflatoxinas, Compost, Cromatografía HPLC-MS, Mohos, Ocratoxina A.

## SUMMARY

This article describes the results obtained after the isolation and identification of the moulds present in samples obtained at different stages of the compost production process from two Catalan composting plants (Blanes and Manresa) as well as compost samples taken from other origins.

Once the moulds were identified, the main goal of the present work was to determine by means of HPLC-MS chromatography if the *Aspergillus* and *Penicillium* strains isolated from the mentioned previous samples were capable to produce aflatoxins and ochratoxin A. None of the isolated strains demonstrated to be mycotoxicogenic.

**Key Words:** Aflatoxins, Compost, HPLC-MS chromatography, Moulds, Ochratoxin A.

## RESUM

Aquest article aporta els resultats obtinguts després de realitzar l'aïllament i identificació de les floridures presents en mostres obtingudes en els diferents estadis de la producció de compost en dues plantes de compostatge catalanes (Blanes i Manresa), així com de mostres de compost final de diferents orígens.

Un cop identificades les floridures, s'avalua la capacitat de produir aflatoxines i ocratoxina A de les soques pertanyents als gèneres *Aspergillus* i *Penicillium* utilitzant cromatografia HPLC-MS.

Es conclou que cap de les soques aïllades és capaç de produir-les.

**Paraules clau:** Aflatoxines, Compost, Cromatografia HPLC-MS, Floridures, Ocratoxina A.

## 1. INTRODUCCIÓN

Entre los contaminantes orgánicos de origen natural, a los que puede estar expuesto el hombre, se encuentran las micotoxinas. Las micotoxinas son producidas por algunas cepas de hongos y su grado de toxicidad varía ampliamente en función de su estructura química [1].

Las aflatoxinas son una familia de micotoxinas con una alta toxicidad. Químicamente, son derivados de difuranocumarinas producidas principalmente por cepas del género *Aspergillus*. Como contaminantes naturales se han descrito cuatro diferentes: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> [2]. Su estructura química se muestra en la Figura 1. En concreto, la aflatoxina B<sub>1</sub> está clasificada por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer en el Grupo 1, es decir, como carcinógena para el hombre [3].

La ocratoxina A (OTA) es producida por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. La molécula de OTA está formada por una isocumarina clorada unida a través de un grupo carboxílico a la L-fenilalanina mediante un enlace amido. Su estructura química se muestra en la Figura 2. La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer clasificó la OTA en el grupo 2B como carcinógeno renal para animales y posiblemente para los humanos [3].

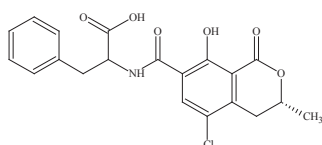


Figura 2. Estructura química de la ocratoxina A (OTA)

Tradicionalmente, la investigación de estas toxinas se ha centrado en alimentos [4] y piensos. No obstante, otros estudios indican que los alimentos pueden no ser la única fuente de exposición a estos tóxicos, contemplándose otras vías de intoxicación como puede ser la inhalación de esporas que vehiculan micotoxinas, hecho descrito en plantas de compostaje [5-7]. A raíz de estos datos, el objetivo de este trabajo es aislar e identificar los mohos presentes en diferentes muestras de compost o de muestras obtenidas durante el proceso de compostaje y, en el caso de aislar cepas pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, evaluar si éstas son capaces de producir aflatoxinas u OTA.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### Muestras

Se analizaron un total de 18 muestras obtenidas en Cataluña: 7 muestras se tomaron en la planta de compostaje de Manresa, 6 en la planta de Blanes, 2 de compost casero en Pineda de Mar, obtenido a partir de residuos vegetales de una cocina familiar (CC final), 2 de compost procedente de residuo sólido urbano procesado en la planta CESPA de Can Barba de Terrassa (RSU final) y una de compost procedente de estiércol de caballo obtenido en un comercio especializado en productos de jardinería (CCB).

En el caso de las muestras obtenidas en la planta de Manresa, estas se tomaron en diferentes momentos del proceso de compostaje: inicio (M inicio), a mitad del túnel de compostaje (M mitad túnel), al final del túnel (M final túnel), tras 15 días de maduración (M 15 días), tras 1 mes de maduración (M 1 mes), tras dos meses de maduración (M 2 meses) y al final del proceso (M final).

En el caso de las muestras obtenidas en la planta de Blanes, se tomaron muestras equivalentes a las de Manresa, con excepción de la muestra a mitad del túnel, ya que el proceso de elaboración que siguen ambas planta es diferente (B inicio, B final de túnel, B 15 días, B 1 mes, B 2 meses y B final).

### Recuento e identificación de los mohos presentes en las muestras.

Se realizó un banco de diluciones decimales de cada muestra en solución salina estéril. A partir de cada dilución y por triplicado, se sembró por agotamiento en superficie 0,1 mL sobre placas de agar extracto de malta adicionadas con 30 ppm de clorhidrato de oxitetraciclina. Las placas se incubaron a 27°C durante una semana, se contaron las colonias y se determinó el número de unidades formadoras de colonias (Ufc) por gramo de muestra. Una vez desarrollados los mohos se procedió a obtener cultivos puros de cada uno de ellos en placas de agar extracto de malta y las cepas fueron identificadas a partir de las características macroscópicas de las colonias y de sus caracteres microscópicos. A continuación, se seleccionaron los pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* para evaluar su capacidad de producir aflatoxinas y ocratoxina A sobre arroz.

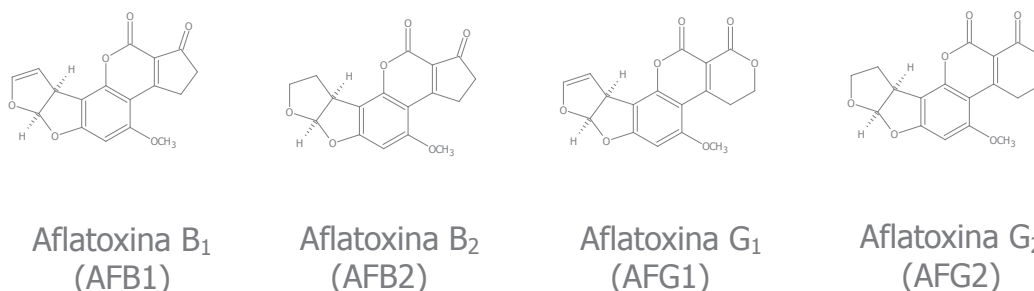


Figura 1. Estructura química de las aflatoxinas

## Estudio de la capacidad micotoxigénica de las cepas de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* aisladas a partir de las muestras

### Inoculación y cultivo de las cepas en arroz

En un erlenmeyer de 100 mL se pesan 5 g de arroz, se le adicionan 5 mL de agua desionizada y se autoclava a 121°C durante 15 min. El arroz se inocula con 2 discos del cultivo de la cepa a evaluar obtenidos a partir de una colonia de 7 días desarrollada sobre agar extracto de malta al 2%. Este procedimiento se repite para cada hongo, según se describe en el método recomendado por la *Food and Drug Administration* (FDA) [8].

Una vez inoculados, los matraces se incuban a 27°C durante 7, 14 y 21 días. Una vez finalizado el período de incubación, se comprueba si la cepa ha producido alguna de las cinco micotoxinas de interés (aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> u OTA) mediante un método de análisis cromatográfico que permite identificarlas simultáneamente [9,10].

Como controles positivos se usan las cepas *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 y *Aspergillus ochraceus* CECT 2948, de las cuales está descrita su capacidad de producir aflatoxinas y ocratoxina A, respectivamente, cuando crecen sobre arroz [9,11].

### Reactivos y Patrones

Se dispone de patrones de las aflatoxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>2</sub> y OTA (>98%). Estos productos han sido suministrados por Sigma-Aldrich, (Barcelona).

Los disolventes utilizados son metanol y acetonitrilo suministrados por VWR (West Chester, Pennsylvania).

### Extracción de las micotoxinas

A partir de cada uno de los cultivos incubados de los hongos en arroz, controles y cepas a evaluar, se procede a extraer las posibles toxinas utilizando como solvente de extracción una mezcla de metanol:agua (90:10). Sobre el total de la muestra, se realizan dos extracciones sucesivas con 45 mL de solvente, se someten a agitación magnética durante 30 minutos y se filtran con papel de filtro Whatman número 3 por gravedad. Los filtrados se recogen en un matraz aforado de 100 mL y se enrasa con el diluyente de extracción.

Estudios realizados sobre muestras de arroz adicionadas a nivel de 2 mg/kg han demostrado que en todos los casos la recuperación de cada una de las toxinas es superior al 90%.

### Preparación de muestra para inyección al cromatógrafo

Se toman 6,6 mL del extracto y se le añaden 5 mL de agua para tener un contenido del 40% en metanol. La dilución resultante se filtra a través de un filtro de nylon de 0.22 µm de tamaño de poro.

### Separación cromatográfica

La separación cromatográfica de las toxinas se realiza mediante un cromatógrafo Waters Alliance 2690. La columna cromatográfica utilizada es una Waters XTerra MS C18 (2.1x100mm, 3.5 µm) a 30°C y flujo de 0,2 mL/min.

Como fase móvil se utiliza una mezcla de (A) metanol y (B) agua con un 0,1% de ácido fórmico, el cual facilita la ionización de las toxinas de interés en el espectrómetro de masas. El gradiente de elución es lineal, incrementándose del 40% A al 85% A en 6 minutos, manteniéndose isocrático

3 min y volviendo a la situación inicial en 1 min. El equilibrio de la columna, antes de una nueva inyección, es de 6 min. El tiempo total de análisis, incluyendo el acondicionamiento inicial de la columna es de 16 min. El volumen de inyección es de 10 µL.

### Espectrometría de masas (ESI-MS)

La espectrometría de masas fue realizada en un espectrómetro de masas de cuadrupolo simple con ionización por electrospray Waters ZMD. La inyección se realiza en modo SIR aplicando ESI positivo de 0 a 9,5 minutos donde se detectarán las aflatoxinas G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, B<sub>2</sub> y ESI negativo de 9,5 a 14 minutos para la detección de la ocratoxina A. El voltaje de cono para el seguimiento del ión primario de las aflatoxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> y OTA fue de 20 V. Para el resto de los iones fue de 40 V.

Los iones primarios monitorizados fueron la molécula protonada en el caso de ESI positivo (*m/z* 313,1 para AFB<sub>1</sub>, 329,1 para AFG<sub>1</sub>, 315,1 para AFB<sub>2</sub>, 331,0 para AFG<sub>2</sub>) y desprotonada en el caso de ESI negativo (*m/z* 402,3 para OTA). Asimismo se monitorizó el aducto con sodio para las cuatro aflatoxinas (*m/z* 335,0 para AFB<sub>1</sub>, 351,0 para AFG<sub>1</sub>, 337,0 para AFB<sub>2</sub>, 353,0 para AFG<sub>2</sub>) y para la OTA, un ión secundario que corresponde a una fragmentación de la molécula (*m/z* 358,1).

Los tiempos de retención para las aflatoxinas fueron de 4,46 min para AFG<sub>2</sub>, 5,54 min para AFG<sub>1</sub>, 6,35 min para AFB<sub>2</sub>, 7,09 min para AFB<sub>1</sub> y para la OTA 10,82 min.

### Método de cuantificación

Para realizar la cuantificación de aflatoxinas y OTA en las muestras se ha realizado por el método del patrón externo. Se ha utilizado un patrón de una mezcla de las cuatro aflatoxinas y la OTA de 0,4mg/L de concentración en fase móvil, ya que se corresponde con el nivel de producción de las micotoxinas por parte de las cepas productoras control. El método es lineal entre 0,1mg/L y 0,5mg/L para las aflatoxinas G<sub>2</sub> y B<sub>1</sub> y entre 0,2mg/L y 1mg/L para las aflatoxinas G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y para la ocratoxina A entre 0,1 mg/L y 1mg/L.

Dada la preparación de muestra indicada, los límites de detección del método para cada una de las aflatoxinas calculado sobre muestra seca es de 0,04mg/kg para la G<sub>2</sub>, 0,07 mg/kg para la G<sub>1</sub>, 0,07mg/kg para la B<sub>2</sub>, 0,04mg/kg para la B<sub>1</sub> y 0,06mg/kg para la OTA.

## 3. RESULTADOS

### Resultados del recuento de hongos

Los resultados obtenidos tras realizar el recuento del número de unidades formadoras de colonia por gramo de muestra (UFC/g) se detallan en la Tabla 1. A partir de los datos obtenidos de las muestras recogidas durante el proceso de compostaje de las plantas de Blanes y Manresa, se observa que el número de mohos disminuye desde el inicio del proceso hasta llegar a la maduración, momento en el que su número aumenta hasta niveles alrededor de 10<sup>6</sup>Ufc/g. El compost procedente de heces de caballo es el que presenta valores de recuento más bajos, posiblemente debido a que el producto se obtuvo envasado, previniendo la recontaminación de origen ambiental. El compost case-ro es el que presentó unos valores más elevados, siendo intermedios los de los compost procedentes de residuos urbanos.



**Tabla 1. Resultados del recuento de mohos en las muestras de compost.**

(M: Muestras procedentes de la depuradora de Manresa; B: Muestras procedentes de la depuradora de Blanes; C C: compost casero; RSU: Muestras procedentes de la planta de compostaje de residuos sólidos urbanos; CCB: Compost de estiércol de caballo)

Muestra	Media (Ufc / g)	Desviación estándar (%)
M inicio	$1.1 \times 10^7$	14,14
M mitad túnel	$3.0 \times 10^5$	10,6
M final túnel	$5.1 \times 10^4$	4,94
M 15 días	$9.5 \times 10^3$	0,7
M 1 mes	$2.7 \times 10^4$	3,53
M 2 meses	$6.8 \times 10^5$	2,82
M final	$8.0 \times 10^5$	12,02
B inicio	$3.2 \times 10^5$	9,19
B final túnel	$2.4 \times 10^4$	8,48
B 15 días	$4.4 \times 10^5$	7,77
B 1 mes	$8.1 \times 10^5$	11,31
B 2 meses	$8.2 \times 10^5$	10,6
B final	$1.5 \times 10^6$	7,77
C C 1	$>10^8$	---
C C 2	$>10^8$	---
RSU 1	$6,35 \times 10^3$	4,94
RSU 2	$1,35 \times 10^4$	9,19
CCB	$<10$	---

#### Resultados de la identificación de los hongos aislados de las muestras

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos tras la identificación de los mohos aislados. Para cada género, se aporta un dibujo de su aspecto microscópico y se detalla a partir de qué muestras fueron aislados. En total, se han aislado mohos de 12 géneros diferentes estando todos ellos ampliamente descritos como contaminantes ambientales. En concreto, del género *Aspergillus* se aislaron 15 cepas y 5 cepas del género *Penicillium*.

#### Resultados de la evaluación de la capacidad micotoxigénica de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* aisladas a partir de las muestras

Tras realizarse el estudio sobre la capacidad de producción de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y de OTA, de acuerdo con el método y criterio establecido por la FDA [7] para considerar una cepa como productora de micotoxinas, se puede asegurar que ninguna de las cepas aisladas de las muestras de compost es aflatoxigénica o productora de OTA. En los ensayos control realizados con las cepas obtenidas a partir de la Colección Española de cultivos Tipo, *A. parasiticus* CECT 2681 y *A. ochraceus* CECT 2948, si se demostró la producción de los metabolitos en estudio, como era de esperar.

En la Figura 3, se aportan los cromatogramas obtenidos tras la inyección de un patrón de las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y OTA de una concentración de 0,4 mg/l en disolución de cada una de las toxinas. Puede observarse que el método permite identificar las cinco micotoxinas de forma simultánea.

La Figuras 4 y 5, respectivamente, corresponden a los cromatogramas que demuestran la producción de aflatoxinas por la cepa *A. parasiticus* CECT 2681 y de OTA por *A. ochraceus* CECT 2948 después de ser incubadas 7, 14 y 21 días en arroz a 27°C

Una vez puesto a punto el método analítico y, comprobado con él la producción de los analitos con las cepas

de los mohos control, se procedió a realizar por triplicado las incubaciones en arroz de cada una de las 20 cepas aisladas e identificadas dentro de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. En ninguno de los experimentos se detectó la formación de las aflatoxinas y OTA por encima de 1mg/kg. Este resultado concuerda con el dato publicado por Navajas *et al.* [10]. En aquel trabajo, los autores afirman no detectar ni aflatoxinas ni OTA en muestras de compost analizadas mediante HPLC-MS; este resultado es coherente con el hecho de que como se ha demostrado en este trabajo, ni siquiera en las condiciones más favorables, como incubando los hongos sobre arroz, las cepas no han demostrado capacidad micotoxigénica.

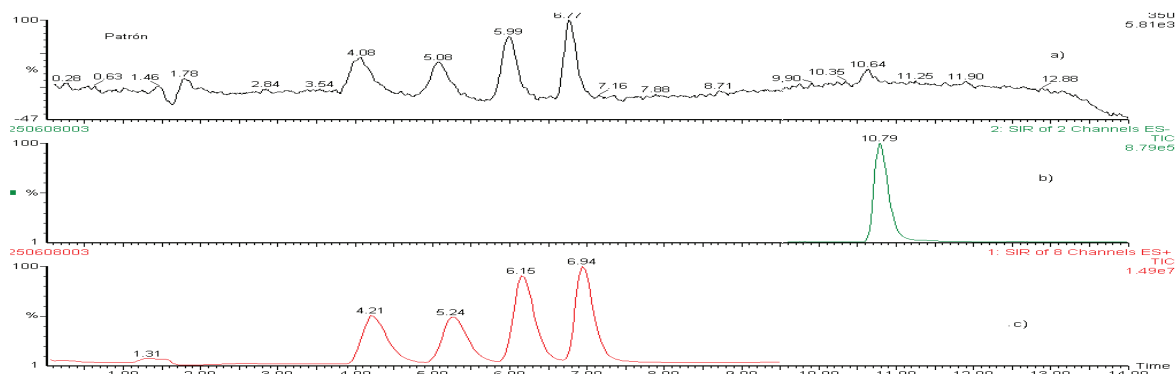
**Tabla 2. Géneros de mohos aislados.**

(M: Muestras procedentes de la depuradora de Manresa; B: Muestras procedentes de la depuradora de Blanes; C C: compost casero; RSU: Muestras procedentes de la planta de compostaje de residuos sólidos urbanos; CCB: Compost de estiércol de caballo).

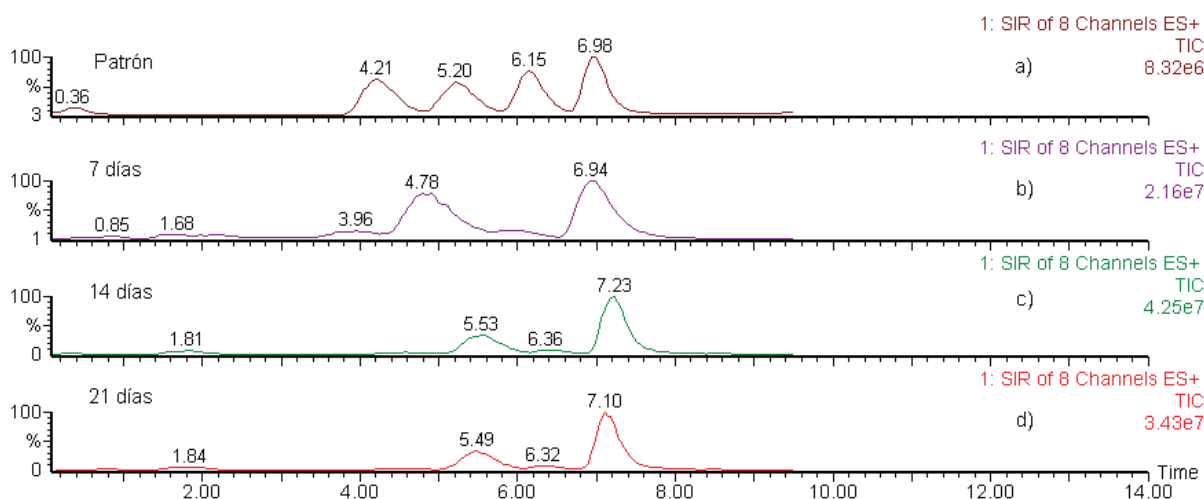
Género	Muestras	Género	Muestras	Género	Muestras
<i>Acremonium</i>	M 1 mes B final túnel B 15 días B 2 meses B final CC 1 C C 2 RSU 1 RSU 2 CCB	<i>Absidia</i>	M inicio M 2 meses B inicio	<i>Aspergillus</i>	M inicio M mitad túnel M final túnel M 2 meses M final B inicio B final túnel B final CC 1 C C 2
<i>Cladosporium</i>	M 2 meses CC 1	<i>Fusarium</i>	M inicio CC 1	<i>Geotrichum</i>	M inicio B inicio
<i>Mucor</i>	M inicio M15 días M 2 meses B inicio B 2 meses B final RSU 1 RSU 2 C C 2	<i>Nigrospora</i>	CC 1	<i>Paecilomyces</i>	CC 1
<i>Penicillium</i>	M inicio M 2 meses M final B inicio CC 1	<i>Periconia</i>	M final	<i>Rhizopus</i>	M inicio M final túnel M15 días M final

## 4. CONCLUSIONES

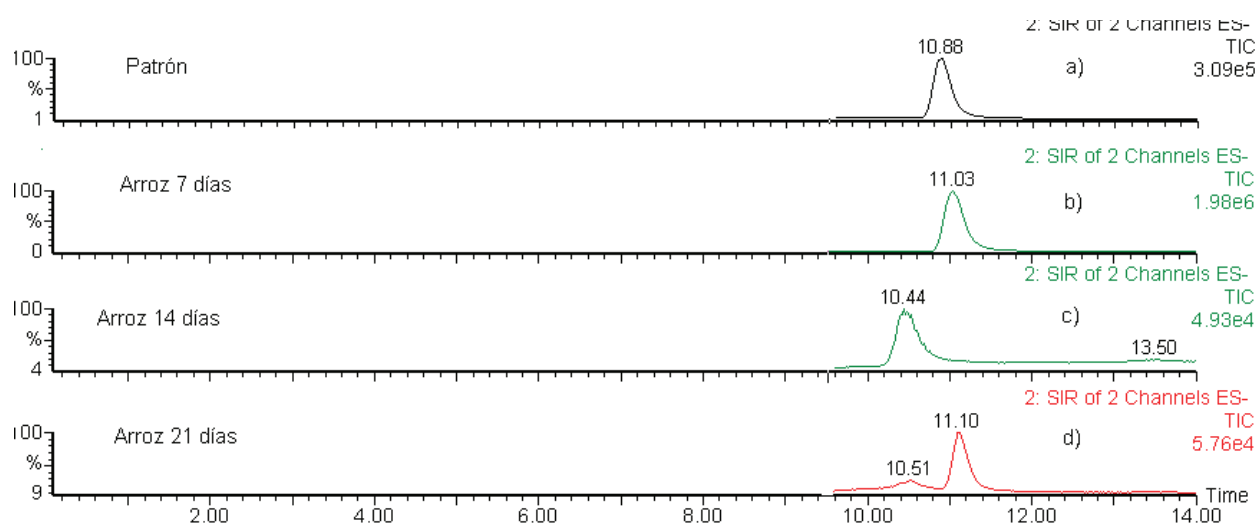
En el trabajo se han aislado mohos de muestras de compost final u obtenidas durante el proceso de compostaje pertenecientes a diferentes géneros contaminantes ambientales habituales. Después de aplicar el método y criterio establecido por la FDA [8] para identificar cepas micotoxigénicas, se puede afirmar que ninguna de las cepas identificadas dentro de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* es capaz de producir aflatoxinas u ocratoxina A.



**Figura 3.** Cromatogramas del patrón de las toxinas. El orden de elución es aflatoxina G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, y OTA. a) Cromatograma en modo SIR negativo; b) Cromatograma en modo SIR positivo.



**Figura 4.** Cromatograma en modo SIR positivo de la evaluación de la cepa *A. parasiticus* CECT 2681 (a) Cromatograma del patrón de concentración 0,4mg/l. (b) (c) (d) Cromatogramas del extracto de cultivo de la cepa control tras 7, 14 y 21 días de incubación en arroz a 27°C.



**Figura 5.** (a) Cromatograma en modo Sir- de un patrón de OTA A de concentración 0,4 mg/l, (b),(c),(d) Cromatogramas en modo Sir- del extracto de cultivo de la cepa control positivo *A. ochraceus* CECT 2948 incubada durante 7, 14 y 21 días en arroz a 27°C.



---

## 5. REFERENCIAS

1. M. Weidenbörner. Encyclopedia of Food Mycotoxins. Ed. Springer, Alemania, 2001.
2. Juan C, Zinedineb A, Montóia JC, Idrissib L, Mañesa J. *Food Control* (2007); **19**: 849.
3. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 56, Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1993.
4. Alfaro C, Broto-Puig F, Agut M, Comellas L. *Afinidad* (2013); **563**: 171-174.
5. Déportes I, SKrivobok S, Seigle-Murandi F, Zmirou D. *Agric. Food Chem* (1997); **45**: 2788-2792.
6. Recer GM, Browne ML, Horn EG, Hill KM, Boehler WF. *Aerobiologia* (2001); **17**: 99-108.
7. Bloom E, Bal K, Nyman E, Must A, Larsson L. *Appl. Environ. Microb.* (2007); **73**: 4211-4217.
8. Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual. USA, 1998.
9. Ventura M, Gómez A, Anaya I, Díaz J, Broto-Puig F, Agut M, Comellas L. *J. Chromat. A* (2004); **1048**: 25-29.
10. Navajas H, Broto-Puig F, Agut M, Comellas L. *Afinidad* (2010); **546**: 94-99
11. Agut M, Comellas L, Fernandez-Ruano L, Ventura M. *Afinidad* (2005); **62**: 363-372